

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
EM BATELADA ALIMENTADA A BAIXA TEMPERATURA

Ivan Ilich Kerbauy Veloso

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

São Carlos – SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ivan Ilich Kerbauy Veloso

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
EM BATELADA ALIMENTADA A BAIXA TEMPERATURA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

São Carlos – SP

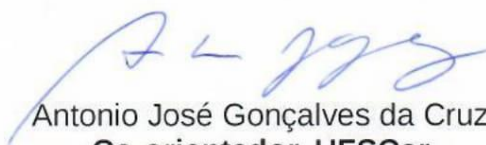
2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE IVAN ILLICH KERBAUY VELOSO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 22 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior
Orientador, UFSCar



Antonio José Gonçalves da Cruz
Co-orientador, UFSCar



Alice Medeiros de Lima
UFSCar



Diego Andrade Lemos
UFTM

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha avó
Alice Homsí Kerbauy e à minha tia
Wanda Lúcia Kerbauy.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus nosso Pai, Jesus nosso mestre, e aos bons Espíritos pelo amparo e proteção na realização de mais uma etapa em minha vida.

À todos os meus familiares pelo apoio financeiro e moral, bem como pela compreensão de minha ausência em alguns momentos ao longo dos dois anos de dedicação ao Mestrado, especialmente à minha mãe Elaine, tia Wanda e avó Alice.

À toda família do Grupo Espírita Emmanuel, trabalhadores, frequentadores e colaboradores, em especial aos amigos Nenê, Sandra, Alan, Fernando, Vera, Yara, Sebastião, Edméia, Francisco, Heloísa, André e Iraci, pelo carinho e amizade.

Aos técnicos Amadeus e Oscar pela ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alberto e ao Prof. Dr. Antonio pela confiança, ensinamento, paciência e preocupação não somente com a pesquisa desenvolvida.

À todos os colegas e amigos da pós-graduação, Jorge, Kaio, Mateus, Diego, Taíse, Rauber, Marina, Letícia, Ricardo, Murilo, Eric, Gustavo e Juliana. Em algum momento no decorrer do Mestrado cada uma dessas pessoas me ajudou de alguma forma, seja no desenvolvimento da pesquisa, na descontração no café ou na surpresa de cada almoço, no lidar com o trabalho em grupo ou na carona de cada dia.

À minha noiva Camila pela paciência, companheirismo, carinho e colaboração não somente nessa jornada de Mestrado.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pelo apoio institucional.

MUITO OBRIGADO!

“Caminhe enquanto tendes luz (...) e aproveite a luz do mundo para fazer luz interior.”

(Jesus)

RESUMO

VELOSO, I. I. K. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura**. 2019. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

O efeito da inibição pelo produto sobre a levedura dificulta a obtenção de vinhos com concentração de etanol acima de $80,0 \text{ g.L}^{-1}$ ($\sim 10 \text{ }^\circ\text{GL}$) no processo industrial de produção de etanol comumente realizado em temperaturas próximas a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. Diminuir a temperatura do caldo de fermentação é uma alternativa para se obter vinhos com maior teor de etanol. Neste trabalho, fermentações em batelada foram realizadas nas temperaturas de $28, 30, 32$ e $34 \text{ }^\circ\text{C}$, com concentração inicial de substrato $180,0 \text{ g.L}^{-1}$, utilizando levedura industrial sob condições operacionais próximas às aplicadas em destilarias brasileiras. O modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel considerando células viáveis apresentou excelente ajuste aos dados experimentais das fermentações em batelada. Os parâmetros cinéticos do modelo foram utilizados para simular e otimizar fermentações conduzidas em batelada alimentada em diferentes temperaturas, resultando em descrições satisfatórias dos comportamentos do processo. Uma estratégia de otimização para obter a máxima produção possível de etanol baseada no parâmetro $C_{E_{\max}}$ (concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular) do modelo de Andrews-Levenspiel proporcionou a obtenção de concentrações de etanol de até $134,7 \text{ g.L}^{-1}$ ($17,1 \text{ }^\circ\text{GL}$) a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ com alimentação de $305,4 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato. Uma modificação foi realizada no modelo de Andrews-Levenspiel, relacionando o parâmetro “n” (constante adimensional relacionada ao potencial tóxico do produto) com a concentração final de etanol (C_{EF}) no vinho, para permitir que o modelo pudesse descrever o comportamento de fermentações em batelada alimentada com alta concentração de substrato na faixa de temperatura de 28 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. Adicionalmente, foram realizadas simulações com elevada concentração celular inicial para avaliar a produtividade do processo. A realização dos experimentos mostrou que o modelo original apresentou limitações para representar condições com elevada concentração de células do inóculo, sendo necessário um reajuste do modelo aos dados experimentais com obtenção de novos valores para os parâmetros cinéticos.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica em batelada alimentada; Inibição pelo produto; Fermentação a baixa temperatura; Modelagem e otimização; Alta concentração de etanol.

ABSTRACT

VELOSO, I. I. K. **Modeling and optimization of fed-batch ethanol fermentation at low temperature**. 2019. 88 p. Dissertation (Master in Chemical Engineering). Federal University of São Carlos, São Carlos, 2019.

The effect of product inhibition on yeast hinders the production of wine with ethanol concentration above 80.0 g L^{-1} ($\sim 10 \text{ }^\circ\text{GL}$) in the industrial ethanol production process commonly performed at $34 \text{ }^\circ\text{C}$. Lowering the fermentation temperature is a way to produce wines with higher ethanol contents. In this work, batch fermentations were carried out at temperatures of 28, 30, 32, and $34 \text{ }^\circ\text{C}$, with initial substrate concentration of 180.0 g L^{-1} , using industrial yeast under conditions reproducing those found in Brazilian distilleries. The Andrews-Levenspiel hybrid kinetic model, considering viable cells, showed an excellent fit to the experimental data. The model kinetic parameters were used to simulate and optimize fed-batch fermentations at different temperatures, resulting in satisfactory descriptions of the process behaviors. A new optimization strategy to obtain the maximum possible ethanol production, based on the $C_{E_{\max}}$ parameter of the Andrews-Levenspiel kinetic model (Maximum concentration of ethanol after which cell growth ceased), provided ethanol production of up to 134.7 g L^{-1} ($17.1 \text{ }^\circ\text{GL}$) at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ and 305.4 g L^{-1} substrate. A modification was made to the Andrews-Levenspiel kinetic model, relating the parameter “n” (dimensionless constant related to the toxic potential of the product) to the final ethanol concentration (C_{E_f}), in order to enable the model to describe the behavior of fed-batch fermentations performed with high substrate concentration and at temperatures from 28 to $34 \text{ }^\circ\text{C}$. In addition, simulations were carried out with high initial cell concentration to verify the increase of process productivity. The results showed that the original model presented limitations to represent process behavior with high cell concentration in the inoculum, being necessary a readjustment of the model to the experimental data obtaining new values for the kinetic parameters.

Keywords: Fed-batch ethanol fermentation; Product inhibition; Fermentation at low temperature; Modeling and optimization; High ethanol concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfis de substrato (S), produtos (P) e volume (V) do processo em batelada alimentada com vazão de alimentação constante.	14
Figura 2 – Esquema do processo fermentativo em batelada alimentada.	15
Figura 3 – Esquema do processo contínuo com tanques em série e reciclo de células.	16
Figura 4 – Via metabólica simplificada da fermentação alcoólica por <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 5 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase.	19
Figura 6 – Principais componentes da <i>S. cerevisiae</i> e membrana celular.	20
Figura 7 – Formação de produto: (a) associada ao crescimento, (b) parcialmente associada ao crescimento e (c) não associada ao crescimento.	24
Figura 8 – Perfis de concentrações de células, substrato e produto num processo descontínuo.	25
Figura 9 – Biorreator tipo torre.	33
Figura 10 – Esquema experimental das fermentações em batelada alimentada.	36
Figura 11 – Câmara de Neubauer com área central destacada.	37
Figura 12 – Quadrante da câmara de Neubauer com células vivas e mortas.	37
Figura 13 – Diagrama de blocos para modelagem e otimização das fermentações em batelada alimentada a partir de parâmetros cinéticos estimados em batelada.	42
Figura 14 – Valores simulados (–) e experimentais (símbolos) de concentração de substrato ao longo das fermentações em batelada: (a) B1 (28 °C), (b) B2 (30 °C), (c) B3 (32 °C) e (d) B4 (34 °C). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.	45
Figura 15 – Valores simulados (–) e experimentais (símbolos) de concentrações de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações BA1, BA2, BA3 e BA4 a (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C, respectivamente, com $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.	48
Figura 16 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações BA1–BA4.	51
Figura 17 – Valores de concentrações simuladas (–) e experimentais (símbolos) de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações em BA com alta concentração de substrato: (a) BA5 (28 °C, $C_{SA}=305,4 \text{ g.L}^{-1}$), (b) BA6 (30 °C, $C_{SA}=262,6 \text{ g.L}^{-1}$), (c) BA7 (32 °C, $C_{SA}=234,2 \text{ g.L}^{-1}$), e (d) BA8 (34 °C, $C_{SA}=207,4 \text{ g.L}^{-1}$). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.	57
Figura 18 – Valores de concentrações simuladas (–) e experimentais (símbolos) de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações em BA com altas concentrações de substrato e células do inóculo: (a) BA9, (b) BA10, (c) BA11 e (d) BA12. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação do teor alcoólico no vinho com a quantidade de vinhaça gerada e o consumo de vapor na destilação.....	31
Tabela 2 – Parâmetros do algoritmo genético empregado no estudo.	40
Tabela 3 – Condições experimentais e parâmetros cinéticos das fermentações em batelada em diferentes temperaturas com $C_{S0}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$	43
Tabela 4 – Equações ajustadas para μ_{\max} , $C_{E\max}$ e K_S em função da temperatura.	44
Tabela 5 – Principais informações dos cultivos em batelada alimentada com $C_{SA}=180 \text{ g.L}^{-1}$	47
Tabela 6 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações em batelada alimentada BA1–BA4, utilizando células totais.	52
Tabela 7 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações em batelada alimentada BA5–BA8.	54
Tabela 8 – Condições experimentais e principais resultados obtidos nas fermentações em batelada alimentada com elevada concentração de substrato na alimentação.....	55
Tabela 9 – Condições experimentais e principais resultados das fermentações em batelada alimentada com elevada concentração de substrato na alimentação e com elevada concentração inicial de células viáveis.	61
Tabela 10 – Novos valores dos parâmetros cinéticos obtidos no ajuste do modelo aos valores experimentais das fermentações com elevada concentração celular inicial.	62

LISTA DE SÍMBOLOS

C_E : concentração de etanol (g.L^{-1})

C_{E0} : concentração inicial de etanol (g.L^{-1})

C_{Ef} : concentração final de etanol (g.L^{-1})

$C_{E\max}$: concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular (g.L^{-1})

C_S : concentração de substrato (g.L^{-1})

C_{SA} : concentração de substrato alimentado em fermentações em batelada alimentada (g.L^{-1})

C_{SM} : concentração de substrato no mosto (g.L^{-1})

C_{S0} : concentração inicial de substrato (g.L^{-1})

C_{VX} : concentração de células viáveis (g.L^{-1})

C_{VX0} : concentração inicial de células viáveis (g.L^{-1})

C_X : concentração total de células (g.L^{-1})

F : vazão de alimentação do mosto (L.h^{-1})

K_{IS} : constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1})

K_S : constante de saturação (g.L^{-1})

n : constante adimensional relacionada ao potencial tóxico do produto (–)

$Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento em etanol ($\text{g}_E.\text{g}_S^{-1}$)

$Y_{VX/S}$: coeficiente de rendimento em células viáveis ($\text{g}_{VX}.\text{g}_S^{-1}$)

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	v
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivos específicos	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. Produção de etanol no Brasil	12
3.2. Processos fermentativos para produção de etanol	13
3.2.1. Fermentação descontínua	13
3.2.2. Fermentação descontínua alimentada	14
3.2.3. Fermentação contínua	15
3.3. Especificações do processo de produção de etanol	16
3.4. Bioquímica da fermentação alcoólica	18
3.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.6. Fatores que influenciam na fermentação alcoólica	21
3.7. Cinética da fermentação alcoólica	23
3.8. Modelos cinéticos de crescimento celular	25
3.8.1. Modelos sem inibição	27
3.8.2. Modelos com inibição	27
3.9. Fermentação com alto teor alcoólico no vinho	30
3.10. Considerações a respeito da bibliografia	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Microrganismo e meio de cultura	32
4.2. Biorreatores	32
4.3. Condições experimentais	33
4.3.1. Fermentações em batelada	33
4.3.2. Fermentações em batelada alimentada	34
4.4. Métodos analíticos	36

4.5. Modelagem matemática.....	38
4.6. Procedimento de estimativa dos parâmetros cinéticos.....	40
4.7. Otimização das fermentações em batelada alimentada.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Fermentação em batelada: ajuste do modelo e determinação de parâmetros cinéticos	43
5.2. Fermentações em batelada alimentada: validação da modelagem.....	46
5.3. Otimização da fermentação em batelada alimentada com alta concentração de substrato	53
5.4. Fermentações com aumento da concentração inicial de células viáveis (C_{VX0}).....	60
6. CONCLUSÕES	65
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE I	77
APÊNDICE II	79
APÊNDICE III	81

1. INTRODUÇÃO

As principais fontes de energia utilizadas atualmente são os combustíveis fósseis. No entanto, a possibilidade de escassez e os impactos ambientais causados pela queima desses combustíveis estimularam o desenvolvimento de fontes alternativas de energia renováveis, sustentáveis e ambientalmente amigáveis (CHENG, 2018). Dentre estes, o bioetanol é o biocombustível mais utilizado no setor de transporte, contribuindo significativamente para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (MOHD AZHAR et al., 2017). Em 2017, a produção mundial de etanol foi de 102,0 bilhões de litros, sendo os Estados Unidos o maior produtor (58%), seguido do Brasil (26%) (RFA, 2017).

Cerca de 85% das destilarias brasileiras realizam o processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada em temperaturas na faixa de 30 a 34 °C, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo produtor de etanol (GODOY et al., 2008; BASSO et al., 2011; DIAS et al., 2015). A fermentação alcoólica industrial consiste em duas etapas. No primeiro estágio (batelada alimentada), o processo inicia com a alimentação de uma suspensão de leveduras dentro do tanque, denominado inóculo ou “pé de cuba” ocupando cerca de 30% do volume útil da dorna. Em seguida, o mosto é gradualmente adicionado até completar o volume da dorna. O mosto é composto por caldo de cana concentrado ou por melaço diluído com caldo de cana ou água de modo a obter concentrações de sólidos solúveis equivalentes a 20 °BRIX (~ 180,0 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais (ART), definidos como glicose + frutose livres e potenciais resultantes da hidrólise da sacarose). A alimentação tem duração de 4 a 6 h (BASSO et al., 2011). Após a alimentação do tanque, o processo tem sequência em batelada (segundo estágio), até o consumo total do substrato (SONEGO et al., 2018). Segundo Thatipamala et al. (1992), efeitos inibitórios do substrato são observados em concentrações superiores a 150,0 g.L⁻¹. O objetivo da adição gradual de substrato à dorna na etapa em batelada alimentada é minimizar o efeito da inibição do substrato na levedura e direcionar o metabolismo microbiano para a rota de formação do produto de interesse (SHULER e KARGI, 2002).

Ao final da fermentação, obtém-se um vinho com um teor de álcool relativamente baixo (~ 10 °GL ou % v.v⁻¹), devido à inibição do crescimento da levedura e da fermentação pelo etanol (DIAS et al., 2015). O etanol afeta o metabolismo celular diminuindo a velocidade de formação de produto em concentrações acima de 40,0 g.L⁻¹, com inibição completa do crescimento das leveduras quando a concentração de etanol atinge cerca de 95,0 g.L⁻¹ na fermentação convencional realizada a 34 °C (AIBA et al., 1968; MAIORELLA et al., 1983).

Os efeitos inibitórios são mais pronunciados em temperaturas mais altas, como resultado da maior fluidez da membrana celular, o que facilita o transporte de substâncias tóxicas para o interior da célula (D'AMORE e STEWART, 1987; PHISALAPHONG et al., 2006).

O processo de destilação do vinho resulta na geração de cerca de 11 litros de vinhaça (principal subproduto da produção de etanol) para cada litro de etanol produzido (DIAS et al., 2012). O grande volume de vinhaça gerado é uma consequência da baixa concentração de etanol no vinho, bem como o elevado consumo de vapor na destilação de aproximadamente 2,15 kg de vapor por litro de etanol produzido (VICENTE, 2015). O elevado volume de vinhaça resulta em elevados custos com o transporte desse subproduto para os canaviais, onde é utilizado como fertilizante (BASSO et al., 2011).

Uma maneira possível de obter um vinho com maior teor alcoólico é realizar a fermentação em temperaturas inferiores às utilizadas em processos convencionais. Isso aumenta a resistência do microrganismo ao etanol, mas torna mais lenta a cinética da reação, devido à alterações fisiológicas da célula que afetam a membrana celular e às atividades enzimáticas das reações bioquímicas (DEED et al., 2015). No entanto, existem benefícios na obtenção de um vinho com maior teor alcoólico, como o menor volume de vinhaça gerado e o menor consumo de vapor durante a destilação (DIAS et al., 2012).

O comportamento dinâmico da fermentação alcoólica pode ser descrito por modelos matemáticos, como proposto em vários estudos anteriores (AIBA et al., 1968; ANDREWS, 1968; LEVENSPIEL, 1980; RIVERA et al., 2006; PHISALAPHONG et al., 2006). Tais modelos podem ajudar no desenvolvimento do processo de fermentação alcoólica, contribuindo para a redução de custos e sendo útil na etapa de controle e otimização do processo. Diversos estudos relatados na literatura abordaram a otimização da fermentação alcoólica, destacando o aumento da produtividade em etanol (WANG e CHENG, 1999; HUANG et al., 2010; ROCHA et al., 2014).

O modelo híbrido de Andrews-Levenspiel, que considera as inibições por substrato e produto, vem sendo amplamente utilizado para descrever o comportamento dinâmico da fermentação alcoólica (LEMOS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018b; SONEGO et al., 2018). Recentemente, Sonego et al. (2018) realizaram a modelagem e otimização da fermentação alcoólica extrativa com arraste de etanol por CO₂, utilizando o modelo de Andrews-Levenspiel. A partir da rotina de otimização os autores encontraram os melhores

valores da vazão de alimentação do mosto e da concentração de etanol a partir da qual deve-se iniciar o arraste gasoso, contornando os efeitos inibitórios relacionados ao substrato e ao etanol.

Estudos anteriores de fermentação em batelada alimentada a baixa temperatura relatam a produção de vinhos com altas concentrações de etanol. Aldiguier et al. (2004) realizaram fermentação alcoólica em batelada alimentada com temperaturas na faixa de 27 a 39 °C, com alimentação periódica de substrato, obtendo 120,4 g.L⁻¹ de etanol e 4,0 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade em etanol a 30 °C. Quando a fermentação alcoólica é realizada a baixas temperaturas, com o objetivo de obter um alto teor alcoólico, é possível alimentar mostos com altas concentrações de substrato durante o processo (ALDIGUIER et al., 2004; RIVERA et al., 2017). No entanto, não foram encontrados estudos sobre a otimização da vazão de alimentação do mosto em fermentações realizadas a baixas temperaturas sob condições operacionais próximas às aplicadas em destilarias brasileiras.

O principal desafio a ser vencido na fermentação alcoólica a baixa temperatura é o aumento da produtividade. A partir da modelagem matemática da fermentação alcoólica em batelada alimentada é possível encontrar uma vazão de alimentação do mosto que maximize a produtividade do processo, contornando a inibição pelo substrato. Com a obtenção de um modelo que descreva a dinâmica da fermentação alcoólica a baixa temperatura, pode-se realizar simulações em diferentes modos de operação, buscando alternativas que aliem alto teor alcoólico no vinho com valores razoáveis de produtividade em etanol. Com isso, a modelagem do processo fermentativo de produção de etanol em batelada alimentada a baixa temperatura é uma ferramenta importante para o avanço da pesquisa e o desenvolvimento do processo, visando o melhoramento da produção de etanol.

2. OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo estudar o efeito da redução da temperatura na fermentação alcoólica em batelada alimentada, visando a obtenção de vinhos com elevado teor alcoólico, bem como realizar a modelagem do processo.

2.1. Objetivos específicos

De modo a alcançar o objetivo proposto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Avaliação da fermentação alcoólica em batelada nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C com concentração de substrato de 180,0 g.L⁻¹.
- Modelagem matemática e obtenção dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica em batelada nas temperaturas estudadas.
- Emprego dos parâmetros cinéticos na modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada nas temperaturas de estudo, alimentado 180,0 g.L⁻¹ de substrato, bem como a realização dos experimentos para fins de validação do modelo.
- Modelagem, otimização e validação experimental do processo em batelada alimentada nas temperaturas de estudo com elevada concentração de substrato na alimentação.
- Simulação e verificação experimental de fermentações sob condições para aumentar a produtividade em etanol do processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de etanol no Brasil

No início da década de 1970, o Brasil importava 80% do petróleo consumido no país. Essa elevada dependência da importação potencializou os efeitos do primeiro choque do petróleo em 1973, devido ao elevado preço do mesmo. Com o objetivo de contornar os efeitos da crise e reduzir a dependência da importação, o governo brasileiro incentivou a produção de etanol combustível em larga escala, implementando o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975 (MICHELLON et al., 2008).

O etanol produzido no Brasil é utilizado principalmente como combustível, seja como etanol hidratado nos veículos *flex-fuel* ou misturado à gasolina (etanol anidro) a fim de baratear o combustível, aumentar sua octanagem e reduzir a emissão de poluentes. O etanol anidro também é utilizado no país na fabricação de tintas, vernizes e solventes (CONAB, 2017).

O Brasil atualmente é o segundo maior produtor mundial de etanol, ficando atrás apenas dos EUA (RFA, 2017). Na safra de 2017/18 a produção brasileira de etanol a partir da cana-de-açúcar foi de 27,76 bilhões de litros, sendo 11,09 bilhões de litros de etanol anidro e 16,67 bilhões de litros de etanol hidratado (CONAB, 2018).

O etanol pode ser produzido a partir de uma variedade de matérias-primas como cana-de-açúcar, milho, beterraba, batata, sorgo, entre outros. No Brasil, a matéria-prima que apresenta menor impacto no custo de produção de etanol é a cana-de-açúcar (BASSO et al., 2011). Na safra 2017/18 cerca de 54% do total de cana-de-açúcar colhida, ou seja 342,98 milhões de toneladas, foi destinada à produção de etanol, sendo o estado de São Paulo responsável por 48% desse montante (CONAB, 2018).

Na obtenção do etanol por via fermentativa a partir da cana-de-açúcar emprega-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua maior produtividade, adequação ao meio e robustez (ATALA, 2004). Aproximadamente 70% das destilarias brasileiras são anexas às instalações industriais produtoras de açúcar e o restante são destilarias autônomas (HENDLER, 2011). Nas destilarias anexas o mosto é composto por melaço diluído com caldo de cana-de-açúcar ou água em proporções suficientes para se obter concentração de açúcares fermentescíveis de 20 °BRIX (BASSO et al., 2011).

3.2. Processos fermentativos para produção de etanol

Muitos processos fermentativos foram desenvolvidos na década de 1950 com a evolução de estudos sobre reatores. Os processos fermentativos se diferem quanto ao tipo de biorreator, modo de adição do substrato e retirada de produtos. Os tipos de operação mais comuns em reatores biológicos são: descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. Nesses processos pode haver recirculação de células, almejando reduzir o tempo gasto em algumas etapas, como por exemplo a preparação do inóculo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

3.2.1. Fermentação descontínua

Conhecido como fermentação em batelada, esse processo é o mais utilizado na indústria alimentícia para obtenção de bebidas e alimentos como cerveja, vinho e iogurte. Nessa fermentação após inocular o meio, nada mais é adicionado à dorna, exceto soluções reguladoras de pH e espuma. Caracterizado por não haver entrada e saída de massa, durante todo o processo o volume reacional permanece constante (CARVALHO e SATO, 2001; SONEGO, 2016).

Dois sistemas podem ser utilizados para esse processo: sistemas de corte ou sistemas de cultura pura (pé-de-cuba). No sistema de cortes realiza-se a primeira fermentação dividindo o volume do caldo em duas dornas, as quais tem seus volumes completados com mosto e deixando fermentar até o consumo total de substrato. No sistema de pé-de-cuba utiliza-se uma cultura pura, a qual o mosto é adicionado até completar o volume da dorna (TOSSETO, 2002).

Ao final do processo descontínuo, o meio fermentado é descarregado do reator e destinado às outras etapas de tratamento para obtenção do produto final. A dorna passa pelo processo de lavagem e é carregada com mosto para a realização de uma nova fermentação. Esse tempo de carga, descarga e lavagem da dorna é chamado “tempo morto”, referindo-se ao tempo em que não ocorreu fermentação e que é contabilizado na duração do processo tornando-o lento (CARVALHO e SATO, 2001; MAIORELLA, 1983).

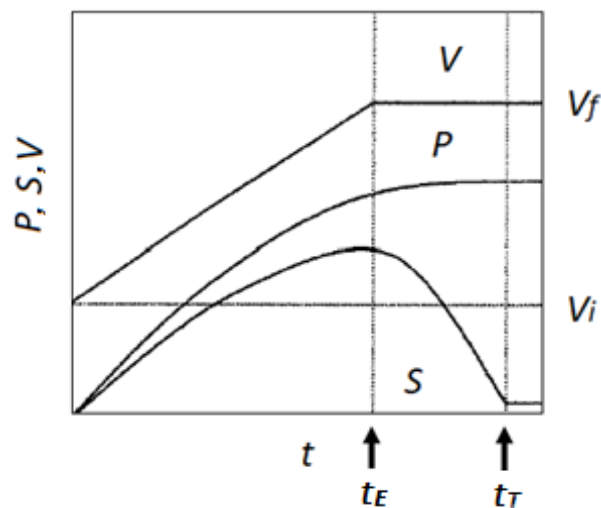
O processo descontínuo caracteriza-se também pelos baixos rendimentos obtidos quando há efeitos inibitórios ou desvios do metabolismo celular gerando produtos indesejados decorrentes da elevada concentração de substrato. Porém, o processo minimiza os riscos de contaminação quando comparado ao processo contínuo (CARVALHO e SATO, 2001).

3.2.2. Fermentação descontínua alimentada

Mais conhecido como batelada alimentada, esse processo é uma variante do processo batelada (TOSETTO, 2002). No processo os nutrientes são alimentados gradualmente no decorrer do cultivo enquanto os produtos permanecem na dorna até o final da fermentação (LESSMANN, 1993). A vazão de alimentação pode variar com o tempo ou permanecer constante e é estabelecida para que ao final do processo o volume útil do reator esteja completo. A adição gradual de substrato na dorna objetiva minimizar os efeitos de inibição pelo substrato e direcionar o metabolismo microbiano à rota metabólica de formação do produto de interesse (CARVALHO e SATO, 2001).

Como o volume total do caldo aumenta durante o cultivo, as concentrações de substrato e de produtos não possuem comportamentos crescentes e constantes como na batelada, apresentando perfis típicos de concentrações de substrato, produtos e volume, como observado na **Figura 1**, onde t_E é o tempo de enchimento, t_T é o tempo total de fermentação e V_f e V_i são os volumes finais e iniciais, respectivamente. (CARVALHO e SATO, 2001).

Figura 1 – Perfis de substrato (S), produtos (P) e volume (V) do processo em batelada alimentada com vazão de alimentação constante.



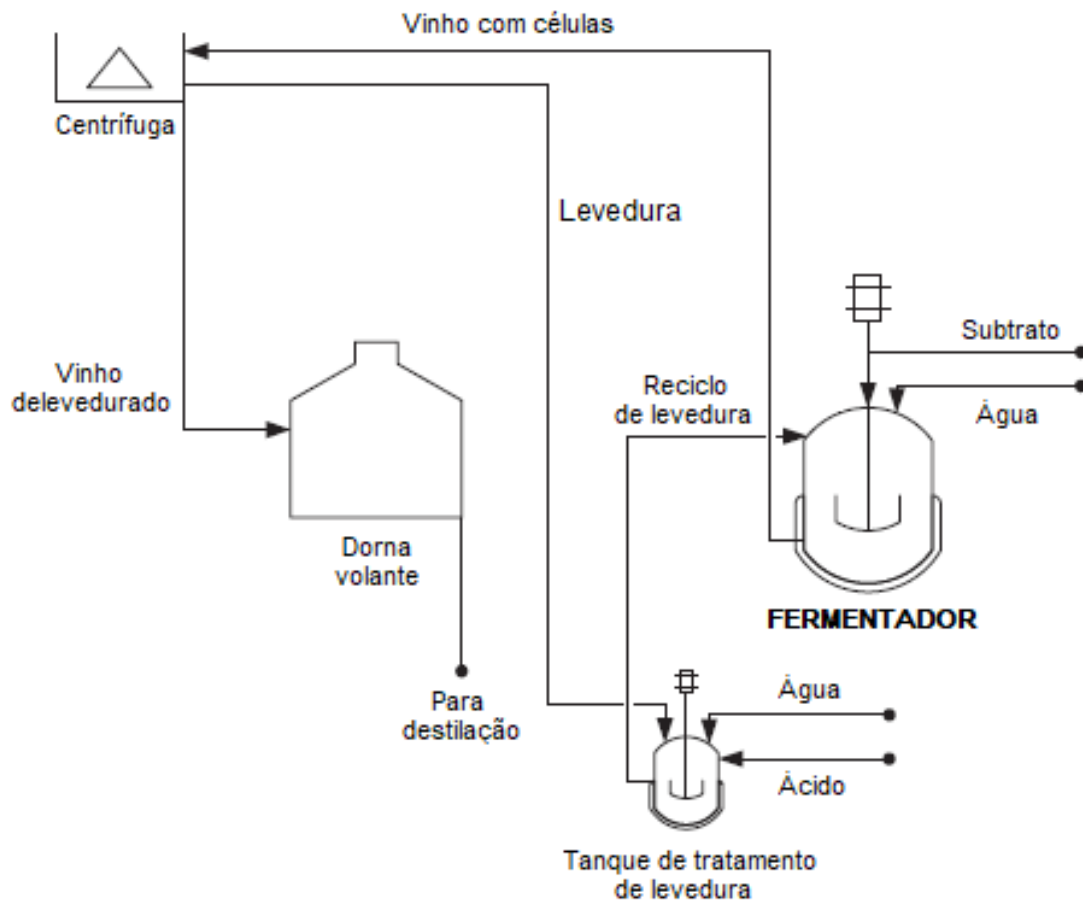
Fonte: adaptado de Carvalho e Sato (2001).

No processo de produção de etanol, ao final da fermentação o caldo passa pelo processo de centrifugação em que ocorre a separação das células (fermento). O vinho de levedurado segue para a destilação e o fermento é reaproveitado, sendo direcionado à outra fermentação depois de sofrer tratamento com ácido. O tratamento de leveduras com ácido promove uma fermentação mais pura e o reciclo de leveduras aumenta a produtividade do processo em relação

à batelada. No processo há ainda a economia de açúcar, em decorrência da menor reprodução celular e, conseqüentemente, elevado rendimento em etanol (TOSETTO, 2002).

Um esquema simplificado do processo de produção de etanol em batelada alimentada é apresentado na **Figura 2**.

Figura 2 – Esquema do processo fermentativo em batelada alimentada.



Fonte: adaptado de Basso et al. (2011).

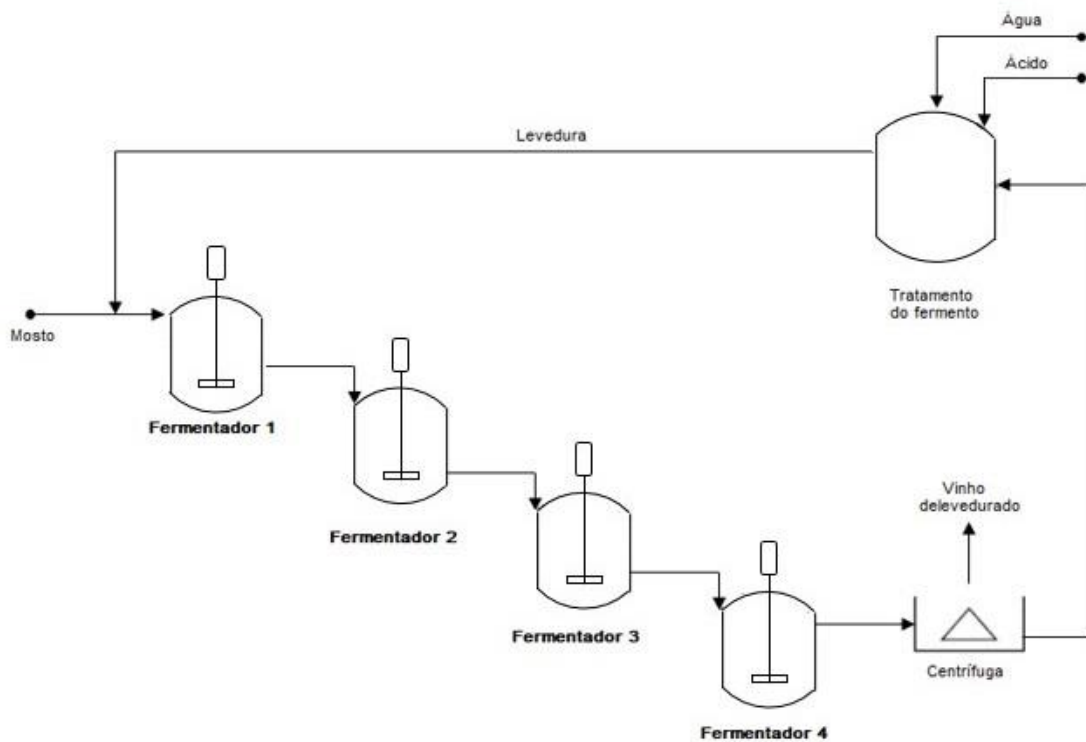
3.2.3. Fermentação contínua

No processo contínuo, o mosto é adicionado continuamente ao reator. O sistema opera em regime permanente (concentrações de células, substrato e produtos constantes ao longo do tempo). Para isso é necessária a retirada do caldo a vazão constante e igual a de alimentação, mantendo o volume útil do reator constante (FACCIOTTI, 2001). Na produção de etanol a fermentação contínua pode ocorrer em tanques ligados em série ou individuais e com ou sem recirculação de células (SONEGO, 2016).

Por operar em regime permanente esse processo apresenta ampla vantagem quando comparado ao processo descontínuo, dentre elas pode-se citar a redução de tempo morto e, conseqüentemente, o aumento da produtividade em etanol; a obtenção de um caldo mais uniforme, facilitando o processo de recuperação do produto; manutenção das células em um mesmo estado fisiológico e redução de mão-de-obra no processo. Em contrapartida, o processo apresenta algumas desvantagens como ocorrência de mutações genéticas espontâneas e ocorrência de contaminações, por ser um sistema aberto (FACCIOTTI, 2001).

Um esquema ilustrativo do processo fermentativo em modo contínuo com tanques ligado em série e com circulação de células é mostrado na **Figura 3**.

Figura 3 – Esquema do processo contínuo com tanques em série e reciclo de células.



Fonte: adaptado de Reis (2011).

3.3. Especificações do processo de produção de etanol

Na produção de etanol no Brasil, o mosto utilizado na fermentação é composto de caldo de cana concentrado (destilarias autônomas) ou um resultado da mistura de melaço e caldo de cana-de-açúcar ou água em proporções adequadas para se obter uma concentração de açúcares fermentescíveis de 20 °BRIX (% de sólidos solúveis). O melaço é um subproduto do processo

de produção de açúcar, composto por água, carboidratos fermentescíveis, compostos não açucarados de origem orgânica e minerais (BASSO et al., 2011).

A operação em batelada alimentada é empregada em aproximadamente 75% das destilarias, enquanto 25% restante operam em modo contínuo, sendo utilizado o reciclo de células em ambos os processos, resultando em uma elevada concentração celular no fermentador (10–14% m.v⁻¹). A alimentação do mosto no processo de batelada alimentada dura de 4 a 6 horas e o processo fermentativo pode durar de 6 a 12 horas, normalmente conduzido em temperaturas entre 32 e 35 °C (BASSO et al., 2011).

A maioria das destilarias do Brasil controlam a temperatura do processo empregando trocador de calor na parte externa da dorna. O meio reacional com temperatura elevada, devido à liberação de 697,7 kJ.kg⁻¹ de glicose consumida, troca calor com a utilidade fria em um trocador de calor de placas em circuito fechado (ALBERS et al., 2002; MAGAZONI, 2011).

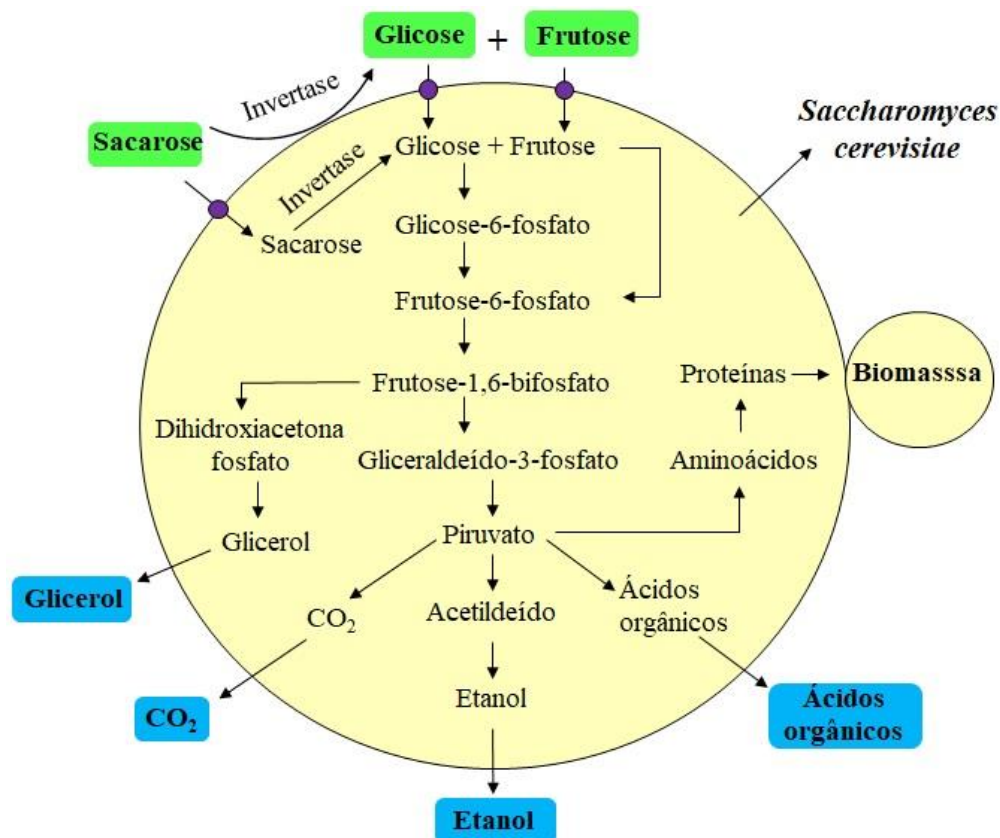
Ao final do processo fermentativo obtém-se um caldo com concentração de etanol em torno de 11 °GL (% v.v⁻¹), com 90–92% de eficiência média em relação ao valor teórico (WHEALS et al., 1999). O caldo é então destinado à etapa de centrifugação, em que as leveduras são separadas do vinho. O creme de leveduras passa por um tratamento com ácido sulfúrico a fim de diminuir a contaminação bacteriana. Após 2 horas de tratamento, as células são reinsertadas na dorna dando início a um novo ciclo. O vinho de levedurado segue para o processo de destilação para purificação e recuperação do etanol (BASSO et al., 2011).

Na destilação são consumidos cerca de 2,16 kg_{vapor}.L_{etanol}⁻¹ para obtenção do etanol a partir de um vinho com 10 °GL (RUIZ, 2015). Nessa etapa obtém-se o principal subproduto do processo de produção de etanol, a vinhaça. Este subproduto é utilizado como fertilizante nas plantações de cana por possuir nutrientes como fósforo, nitrogênio, potássio, óxidos e sulfatos. A cada litro de etanol produzido, são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça, sendo essa elevada quantidade atribuída ao baixo teor de etanol no vinho (SILVA e CABEDA, 2006; AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2011).

3.4. Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é compreendida como a transformação de açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico pela ação de microrganismos (LIMA e MARCONDES, 2002). Tal processo biológico é anaeróbico e ocorre no citoplasma celular, onde encontram-se enzimas envolvidas no processo. A conversão de açúcar em etanol envolve uma sequência ordenada de reações enzimáticas (LIMA et al., 2001), como ilustrado na **Figura 4**. As enzimas que participam dessa série de reações são conhecidas como “glicolíticas” e suas ações podem ser influenciadas por fatores como temperatura, pH, nutrientes do meio fermentativo, inibidores, entre outros (LIMA et al., 2001). Ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, o microrganismo objetiva a produção de energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) utilizada para a multiplicação e manutenção celular. Contudo, os produtos obtidos através da fermentação alcoólica (etanol, CO₂, glicerol, entre outros) são apenas excreção e não possuem utilidade metabólica para a célula (LIMA et al., 2001).

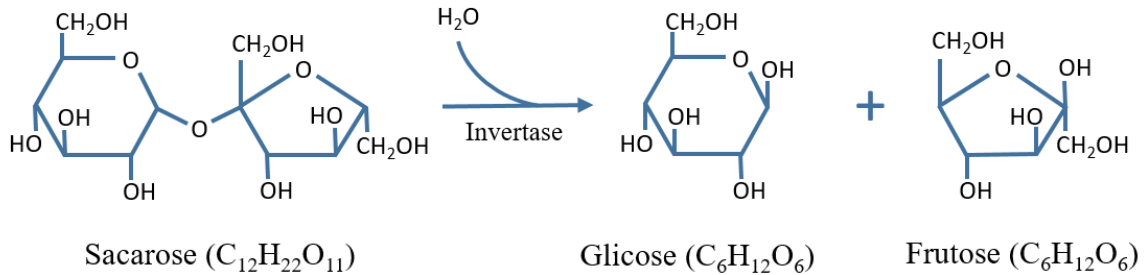
Figura 4 – Via metabólica simplificada da fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*.



Fonte: traduzido de Rodrigues et al. (2018b).

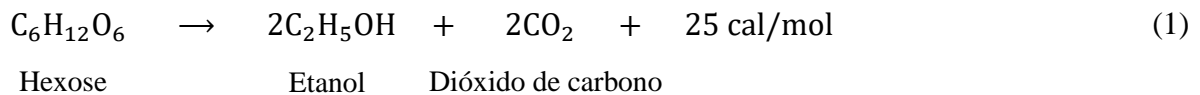
Como observado na **Figura 4**, o etanol é formado pelas leveduras a partir de monossacarídeos (hexoses). O mosto utilizado na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é majoritariamente composto por sacarose, sendo necessário a ação da enzima invertase para converter a sacarose (oligossacarídeo) à glicose e frutose, segundo a reação de hidrólise apresentada na **Figura 5**.

Figura 5 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase



Fonte: acervo pessoal do autor.

A glicose e frutose formadas a partir da reação de hidrólise da sacarose ou já presentes no mosto, são convertidas principalmente em etanol e dióxido de carbono, na ausência de oxigênio, conforme a reação abaixo (LOPES e BORGES, 2009).



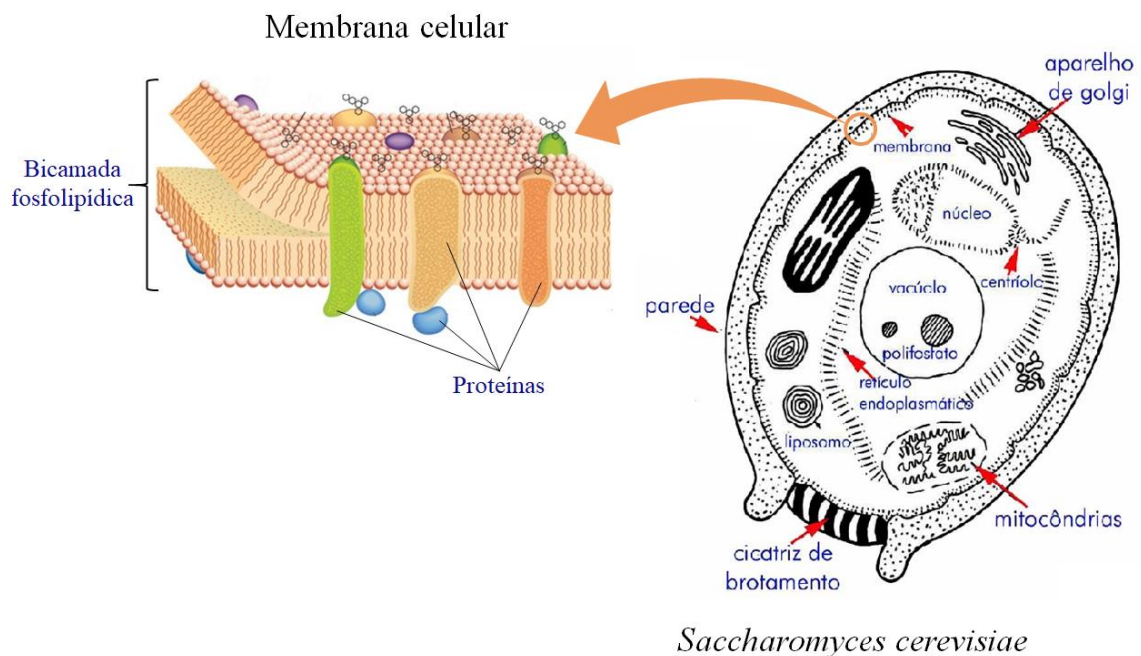
As massas molares de hexose, etanol e dióxido de carbono são 180 , 42 e $44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Logo, pela estequiometria da reação, 1 mol de hexose (180 g) são convertidos em 2 mols de etanol (92 g) e 2 mols de dióxido de carbono (88 g). A partir desses valores obtém-se os coeficientes de rendimento teórico de substrato a etanol ($0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}\cdot\text{g}_{\text{hexose}}^{-1}$) e de substrato a CO_2 ($0,489 \text{ g}_{CO_2}\cdot\text{g}_{\text{hexose}}^{-1}$). No entanto esses valores não são observados na prática, devido ao direcionamento do substrato à produção de glicerol, ácidos orgânicos e biomassa (ver **Figura 4**). O valor de rendimento em etanol obtido nas destilarias está entre 89 e $91,5\%$ do teórico (DIAS, 2015).

3.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Pertencentes ao reino Fungi, as leveduras são unicelulares, eucariontes, heterótrofas e possuem parede celular definida (FERNANDES, 2009). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui formato elíptico e tamanhos na faixa de 5–10 μm no diâmetro maior e de 1–7 μm no diâmetro menor (KREGGER-VAN RIJ, 1987). Sua reprodução ocorre por brotamento (ou gemulação), em que a célula mãe dá origem a um broto (ou gêmula) que cresce até que ocorra a divisão celular. Após a separação, a célula mãe fica marcada por uma cicatriz que originou a célula filha.

A **Figura 6** mostra os principais componentes da *S. cerevisiae* com destaque para a membrana celular. Formada por uma bicamada fosfolipídica e proteínas, a membrana plasmática é uma barreira relativamente impermeável para moléculas hidrofílicas. As proteínas que a compõem atuam como mediadoras na captação seletiva e/ou excreção de solutos (REST et al., 1995). Alguns fatores como temperatura, oxigênio e limitações de nutrientes afetam a membrana, alterando sua composição (HUNTER e ROSE, 1972; RATLEDGE e EVANS, 1989).

Figura 6 – Principais componentes da *S. cerevisiae* e membrana celular.



Fonte: adaptado de Lodishi et al. (2000) e Batista (2005).

A função da parede celular da levedura *S. cerevisiae* é, dentre outras, proteger a célula contra choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos (FLEURI e SATO, 2005). A parede celular consiste de 30 a 40% da massa seca da célula e está em contínua mudança e crescimento (HOUGH e MADDOX, 1970).

3.6. Fatores que influenciam na fermentação alcoólica

- *Etanol*

O principal componente tóxico para a levedura durante a fermentação é o etanol acumulado no caldo (MAIORELLA et al., 1983). Alguns fatores influenciam na sensibilidade da levedura ao etanol, como temperatura, aeração e composição do meio. O etanol pode agir direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática modificando a membrana lipídica, interferindo no transporte de soluto e na ação de enzimas (ALVES, 1996).

A toxidez do etanol afeta o metabolismo celular, diminuindo a velocidade de formação do mesmo, em concentrações acima de 40 g.L⁻¹, chegando a inibir completamente o crescimento das leveduras quando atinge concentrações em torno de 95 g.L⁻¹ em cultivos a 34 °C (AIBA et al., 1968; MAIORELLA et al., 1983).

- *Temperatura*

A temperatura afeta as reações bioquímicas da levedura, exercendo efeitos sobre o crescimento, metabolismo e viabilidade dos microrganismos (TORIJA et al., 2003; SOUZA, 2009). A faixa de temperatura ótima para a produção de etanol é de 26 a 35 °C, porém com o aumento da temperatura, a contaminação bacteriana é favorecida e os efeitos tóxicos do etanol aumentam, sendo a viabilidade celular afetada em temperaturas superiores a 35 °C (LIMA et al., 2001; TORIJA et al., 2003).

Em temperaturas mais baixas obtém-se elevados rendimentos alcoólicos, no entanto a produtividade diminui devido ao elevado tempo de fermentação (TORIJA et al., 2003). Além disso, com a redução da temperatura há um aumento da resistência da levedura ao teor final de etanol, bem como redução de subprodutos do metabolismo celular, em consequência do menor estresse sofrido pelas células (LORA e VENTURI, 2012).

A toxicidade do etanol à levedura é mais acentuada conforme aumenta-se a temperatura, em decorrência do aumento da fluidez da membrana celular, facilitando o transporte de substâncias tóxicas para o interior da célula (PHISALAPHONG et al., 2006; FERNANDES, 2008). A levedura responde ao efeito do aumento de temperatura mudando a composição de ácidos graxos da membrana celular (WANDERLEY, 1997). Segundo Amorim et al. (1996), o efeito tóxico do etanol é constante para a levedura *S. cerevisiae* na faixa de temperatura de 12 a 28 °C, sendo intensificado em temperaturas acima dessa faixa.

- *Substrato*

O aumento da osmolaridade externa provocada pelo excesso de substrato resulta no estresse da levedura, provocando redução do crescimento e perda de viabilidade (DIAS, 2008; SOUZA, 2009; SCHULZ 2010). Os efeitos inibitórios são observados em concentrações superiores a 150 g.L⁻¹ (THATIPAMALA et al., 1992). Para contornar esse tipo de inibição, o processo industrial opera em batelada alimentada, atingindo concentrações máximas de substrato de 70 g.L⁻¹ no processo a 34 °C (BASSO et al., 2011).

- *pH*

O pH possui influência significativa na fermentação alcoólica, principalmente no controle da contaminação bacteriana, na velocidade da fermentação e na formação de subprodutos (AMORIM, 1996). O processo fermentativo se desenvolve em ampla faixa de pH, sendo a faixa ótima entre 4,0 e 5,5. Nos processos industriais os valores de pH geralmente ficam entre 4,5 e 5,5 (LIMA et al., 2001). Valores de pH muito baixos ocasionam perdas de nutrientes como nitrogênio e potássio e aumentam a sensibilidade da levedura ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao dióxido de enxofre (GOMES, 1988).

Nas fermentações industriais, a levedura separada do vinho por centrifugação, passa por um tratamento com ácido sulfúrico, mantendo o pH entre 2,0 e 3,0, a fim de reduzir a contaminação bacteriana e reutilizá-la no processo (LIMA et al., 2001). Apesar de ser um tratamento estressante para a levedura, a redução significativa de bactérias contaminantes, torna o uso de ácido vantajoso ao processo (AMORIM, 1996).

- *Contaminação bacteriana*

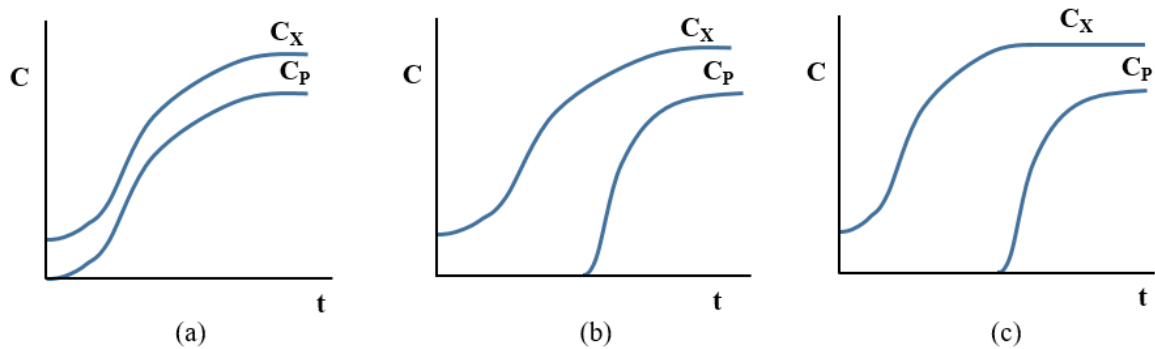
Microrganismos contaminantes podem se desenvolver na dorna de fermentação dependendo das condições de operação do processo como temperatura, pH, concentração de açúcares, assepsia e preparação do inóculo e do mosto. Esses microrganismos competem com a levedura pelo mesmo substrato, geram subprodutos que inibem o crescimento da levedura, aumentam a acidez do caldo, produzem substâncias que causam estresse celular como ácido láctico, ácido acético e biopolímeros (dextrana e levana), promovem a floculação das leveduras e a formação de espumas (DARÉ, 2008; LOPES e PARAZZI, 2007; NAVES et al., 2010).

3.7. Cinética da fermentação alcoólica

O estudo da cinética da fermentação se dá a partir do tratamento de dados de concentrações de células, de substrato (açúcares redutores totais) e de produtos de interesse ao longo do processo. Na fermentação ocorrem diversas transformações ao longo do tempo, como crescimento celular, consumo de substrato e produção de metabólitos (HISS, 2001). O estudo da velocidade das transformações observadas permite a compreensão da influência de fatores como pH, temperatura, agitação, inibidores, entre outros sobre a cinética da fermentação (SONEGO, 2016). Além disso, o conhecimento da cinética da fermentação alcoólica permite elaborar estratégias de controle e otimização que visam a maximização da produção (ANDRIETTA, 1994; DARÉ, 2008).

Três possibilidades de formação de produtos em processos fermentativos são observadas: associada ao crescimento celular, parcialmente associada ao crescimento ou não associada ao crescimento (BASTOS, 2010). Na formação de produto associada ao crescimento (**Figura 7 (a)**) a geração de produto ocorre simultaneamente ao processo de multiplicação celular. Na **Figura 7 (b)** observa-se que a geração de produto inicia-se quando ainda há multiplicação celular, característica da formação de produto parcialmente associada ao crescimento. Na **Figura 7 (c)**, a geração de produto só tem início a partir do momento em que o crescimento celular cessa, caracterizando a formação de produto não associada ao crescimento.

Figura 7 – Formação de produto (a) associada ao crescimento, (b) parcialmente associada ao crescimento e (c) não associada ao crescimento.



Fonte: adaptado de Bastos (2010).

Luedeking e Piret (1959) propuseram um modelo para representar a cinética de formação de produto, dado pela **Equação 2**.

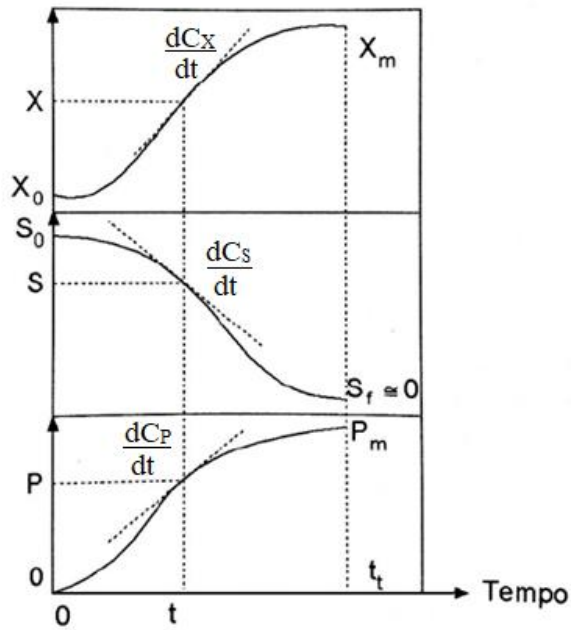
$$\mu_P = \alpha \cdot \mu + \beta \quad (2)$$

onde μ_P é a velocidade específica de formação de produto ($g_P \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}) e α e β são parâmetros do modelo cinético associado e não associado ao crescimento celular, respectivamente.

Na fermentação alcoólica, a formação de produto está intimamente associada ao crescimento celular (SONEGO, 2016). Logo o termo α da **Equação 2** (associado ao crescimento) é muito maior que o termo β (associado a quantidade de biomassa), ou seja, nesse caso o segundo termo pode ser desconsiderado no modelo (BASTOS, 2010).

A **Figura 8** ilustra as concentrações de célula (X), substrato (S) e produto (P) ao longo do tempo num processo descontínuo (batelada).

Figura 8 – Perfis de concentrações de células, substrato e produto num processo descontínuo.



Fonte: adaptado de Hiss (2001).

A partir das curvas observadas na **Figura 8**, com base nos balanços de massa é possível obter as velocidades instantâneas de crescimento do microrganismo (X), consumo de substrato (S) e formação de produto (P), dadas pelas equações a seguir:

$$r_X = \frac{dC_X}{dt} \quad (3)$$

$$r_S = -\frac{dC_S}{dt} \quad (4)$$

$$r_P = \frac{dC_P}{dt} \quad (5)$$

3.8. Modelos cinéticos de crescimento celular

A modelagem da fermentação alcoólica descreve, a partir de equações matemáticas, a dinâmica do processo fermentativo. O uso de modelos permite, por meio de simulação, a análise das interações entre parâmetros e variáveis. Além disso proporciona um melhor entendimento do processo, sendo útil para as etapas de otimização e controle da fermentação (RIVERA et al., 2006).

A velocidade específica de crescimento (μ) é expressa por modelos cinéticos compostos por equações matemáticas que são funções da concentração de substrato limitante (C_S). Além de C_S , alguns modelos são encontrados na literatura como função da concentração celular (C_X) e da concentração de produto (C_P). Segundo Bonomi e Schmidell (2001), os modelos cinéticos normalmente utilizados para representar o crescimento celular na fermentação alcoólica, são classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular (modelos estruturados e não estruturados) e quanto à heterogeneidade da população microbiana (modelos segregados e não-segregados). A seguir, encontram-se as definições de cada tipo de modelo (BONOMI e SCHMIDELL, 2001):

- Modelos estruturados: o microrganismo é descrito com maiores detalhes, considerando componentes intracelulares estruturais, o que permite descrever o estado das células e sua adaptação ao meio ambiente.
- Modelos não-estruturados: a biomassa é caracterizada por uma única variável (massa celular ou número de células), não considerando variações de componentes intracelulares na previsão do comportamento cinético do processo, ou seja, desconsiderando variações na estrutura celular.
- Modelos segregados: a população celular é heterogênea com distribuição de idade, tamanho e propriedades celulares.
- Modelos não-segregados: a população celular é considerada homogênea, ou seja, apresentam o mesmo comportamento.

Devido à maior complexidade e maior esforço computacional, os modelos segregados e estruturados descrevem mais detalhadamente o comportamento cinético da fermentação alcoólica em relação aos modelos não-estruturados e não-segregados (BONOMI e SCHMIDELL, 2001). Entretanto, modelos não-estruturados e não-segregados são os mais encontrados para descrever a dinâmica da fermentação alcoólica, em virtude do menor número de variáveis envolvidas e na facilidade de obtenção de um número menor de parâmetros cinéticos necessários (ANDRIETTA, 1994).

Os modelos que descrevem o comportamento dinâmico da fermentação alcoólica baseiam-se na determinação da velocidade específica de crescimento (μ). Os modelos cinéticos encontrados na literatura podem ser divididos em dois grupos: modelos livres de inibição e

modelos que consideram inibição por substrato, células e/ou produto, apresentados a seguir (BADINO e CRUZ, 2012).

3.8.1. Modelos sem inibição

- **Modelo de Monod** (1942):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (6)$$

onde μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}); K_S é a constante de saturação ($g.L^{-1}$) e C_S é a concentração de substrato limitante.

O modelo de Monod serviu como base para outros modelos cinéticos de crescimento sem inibição, dentre os quais se destacam o modelo de Moser (1958) e o modelo de Contois (1959).

- **Modelo de Moser** (1958):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S^u}{K_S + C_S^u} \quad (7)$$

onde u é um parâmetro adimensional do modelo.

- **Modelo de Contois** (1959):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S \cdot C_X + C_S} \quad (8)$$

onde C_X é a concentração celular ($g.L^{-1}$).

3.8.2. Modelos com inibição

A velocidade específica de crescimento celular (μ) pode ser afetada por diversos fatores. Alguns modelos cinéticos consideram esses fatores como sendo a inibição pelo produto formado pelas células, pelo substrato limitante ou ainda a inibição celular, quando a concentração de células é elevada. Encontram-se ainda na literatura modelos de inibição mista que consideram dois ou mais inibidores.

a) Inibição pelo substrato

- **Modelo de Andrews (1968):**

Também conhecido como “modelo de Monod com inibição pelo substrato”, este é considerado o modelo mais aceito para descrever a inibição pelo substrato.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \quad (9)$$

onde K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1}).

- **Modelo de Wu (1988):**

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^v}{K_{IS}}} \quad (10)$$

onde v é um parâmetro adimensional do modelo.

b) Inibição pelo produto

- **Modelo de Aiba – Shoda – Nagatani (1968):**

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot e^{(-K_P \cdot C_P)} \quad (11)$$

onde K_P é a constante de inibição pelo produto (g.L^{-1}).

- **Modelo de Levenspiel (1980):**

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (12)$$

onde n é um parâmetro adimensional do modelo e C_P^* é a concentração crítica de produto a partir da qual cessa o crescimento celular (g.L^{-1}).

- **Modelo de Hoppe – Hansford (1982):**

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + C_P} \quad (13)$$

onde K_{IP} é a constante de inibição pelo produto (g.L^{-1}).

c) Inibição celular

- **Modelo de Lee – Pollard – Coulman (1983):**

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \quad (14)$$

onde m é um parâmetro adimensional do modelo e C_X^* é a concentração crítica de células a partir da qual cessa o crescimento celular (g.L^{-1}).

d) Inibição mista

Alguns modelos consideram inibição mista envolvendo substrato/produto, produto/células, substrato/células e substrato/células/produto. A seguir encontram-se exemplos de modelos híbridos considerando as combinações de inibição.

- **Andrews/Levenspiel:**

Considera inibição pelo substrato e pelo produto.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (15)$$

- **Levenspiel/Lee – Pollard – Coulman:**

Considera inibição pelo produto e por células.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \quad (16)$$

- **Andrews/Lee – Pollard – Coulman:**

Considera inibição pelo substrato e por células.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \quad (17)$$

- **Andrews/Lee – Pollard – Coulman/Levenspiel:**

Considera inibição pelo substrato, por células e pelo produto.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (18)$$

3.9. Fermentação com alto teor alcoólico no vinho

Segundo Amorim et al. (2011), os benefícios da fermentação alcoólica com elevada concentração de etanol no vinho são a redução do volume de vinhaça gerado, a redução no consumo de vapor na destilação, economia de insumos (ácido sulfúrico e antibiótico), economia de água e redução do número de equipamentos do processo. Para a obtenção de vinhos mais concentrados em etanol, o mosto adicionado à dorna necessita ser menos diluído que o mosto alimentado no processo convencional nas destilarias brasileiras, justificando a economia de água no processo. A elevada concentração do mosto adicionado à dorna, resulta em volumes de trabalho menores, podendo-se trabalhar com dornas de volumes reduzidos e diminuir o número de centrífugas.

Um das alternativas para obtenção de vinhos com elevado teor alcoólico é reduzir a temperatura da fermentação, uma vez que o microrganismo torna-se mais resistente ao etanol devido a alterações na fisiologia da membrana celular. Fermentações realizadas por Cruz (2015) nas temperaturas de 25 e 32 °C mostram que as máximas concentrações de etanol alcançadas no processo em batelada alimentada nessas temperaturas foram de 137,0 e 124,0 g.L⁻¹, respectivamente. Em fermentações conduzidas a 26 °C em batelada alimentada com alimentação constante de 240,0 g.L⁻¹ de sacarose, a autora obteve ao final da fermentação um vinho com teor alcoólico elevado de 14,4 °GL. Porém, a produtividade em etanol obtida foi de 6,0 g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹, devido ao elevado tempo de processo de 19 horas. Num estudo anterior,

Aldiguier et al. (2004) obtiveram vinhos com elevado teor alcoólico de 120,4 g.L⁻¹ de etanol e produtividade de e 4,0 g.L⁻¹.h⁻¹, operando a 30 °C em batelada alimentada, adicionando-se à dorna pulsos de substrato ao longo do tempo.

Em média, a geração de vinhaça é de 11 L_{vinhaça}.L_{etanol}⁻¹, logo na safra 2017/18 em que a produção de etanol foi de 27,76 bilhões de litros, foram gerados aproximadamente 305 bilhões de litros de vinhaça (CONAB, 2018). A utilização da vinhaça como fertilizante apresenta limitações econômicas, como o custo de armazenamento e transporte para a lavoura que fica em torno de R\$ 7,80/m³ de vinhaça (RUIZ, 2015; SILVA, GRIEBELER, BORGES, 2007). Segundo Lopes et al. (2016), conforme o teor alcoólico do vinho aumenta, a quantidade de vinhaça gerada é reduzida, como mostra a **Tabela 1**. Tomando como base a produção de etanol na safra de 2017/18, um vinho com 14 °GL resultaria na redução de 58,4 bilhões de litros de vinhaça, quando comparado a um vinho com 11 °GL, o que implicaria em uma economia de R\$ 455,4 milhões.

Tabela 1 – Relação do teor alcoólico no vinho com a quantidade de vinhaça gerada e o consumo de vapor na destilação.

Teor alcoólico no vinho (°GL ou %v.v ⁻¹)	Geração de vinhaça (L _{vinhaça} .L _{etanol} ⁻¹)	Consumo de vapor (kg _{vapor} .L _{etanol} ⁻¹)
10	9,4	2,16
11	8,5	1,99
12	7,7	1,85
13	7,0	1,74
14	6,4	1,61
15	5,9	1,52
16	5,4	1,46

Fonte: adaptado de Lopes et al. (2016) e Ruiz (2015).

Com o aumento do teor alcoólico no vinho, há uma redução no consumo de vapor na etapa de destilação, conforme mostra a **Tabela 1** (RUIZ, 2015). Assim, um vinho com teor alcoólico de 14 °GL, resultaria na economia de 10,5 milhões de toneladas de vapor na destilação (em relação ao vinho com 11 °GL), podendo essa energia ser direcionada para a cogeração de energia elétrica.

3.10. Considerações a respeito da bibliografia

Muitos estudos avaliaram a redução da temperatura como principal maneira de se obter vinhos com elevado teor alcoólico, resultando em redução de custos energéticos na etapa de destilação e redução no volume de vinhaça gerado. A modelagem da fermentação alcoólica com elevada concentração de etanol no vinho também foi abordada em diversos estudos da literatura. No entanto, são poucos os estudos que se referem à modelagem da fermentação alcoólica a baixa temperatura em condições industriais, ou seja, fermentação em batelada alimentada utilizando levedura industrial. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada em diferentes temperaturas, bem como realizar a otimização da vazão de alimentação do processo, cobrindo lacunas ainda existentes em estudos da fermentação alcoólica em condições industriais a baixa temperatura visando a obtenção de altas concentrações de etanol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e meio de cultura

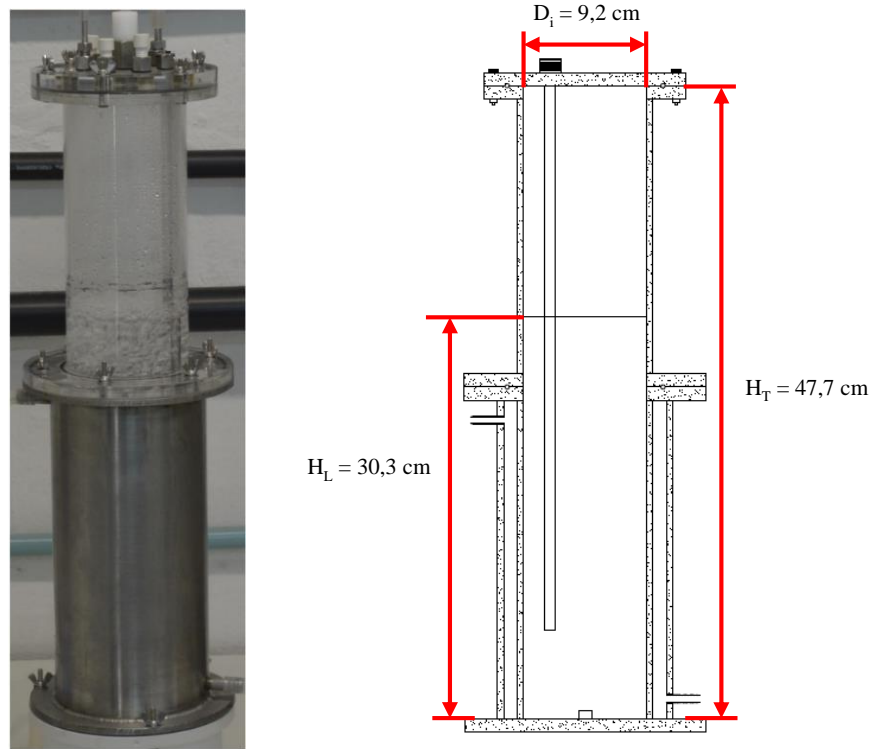
O microrganismo produtor de etanol utilizado neste estudo foi a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 na forma liofilizada, gentilmente cedida pela AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. O meio de cultura, simulando melaço industrial de cana-de-açúcar diluído com caldo de cana-de-açúcar, foi preparado utilizando reagentes de grau analítico que continham os nutrientes necessários para o crescimento celular e a produção de etanol. O meio de cultura teve a seguinte composição (em g.L⁻¹ de água destilada): sacarose (171,0–290,0, equivalente a 180,0–305,0 açúcares redutores totais, ART), KH₂PO₄ (5,60), MgSO₄.7H₂O (1,40), extrato de levedura (6,80) e ureia (5,32). O pH inicial foi ajustado em 4,6 com adição de solução de HCl 1,0 M. Os componentes KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura e ureia foram aumentados em 20% nos experimentos em que a concentração do substrato foi superior a 180,0 g.L⁻¹ ART.

4.2. Biorreatores

As fermentações em batelada (B) foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume útil de 200 mL incubados em agitador orbital (Modelo SL 221, Solab). As fermentações em batelada alimentada (BA) foram realizadas em biorreator tipo torre com

volume de trabalho de 2 L, composto por uma parte superior transparente de acrílico e uma base encamisada (parte inferior) de aço inoxidável, ilustrado na **Figura 9**. As principais dimensões do reator são: altura total ($H_T=47,7$ cm), altura do líquido ($H_L=30,3$ cm) e diâmetro interno ($D_i=9,2$ cm).

Figura 9 – Biorreator tipo torre.



Fonte: acervo pessoal do autor.

4.3. Condições experimentais

4.3.1. Fermentações em batelada

Quatro fermentações em batelada (B1, B2, B3 e B4) foram realizadas nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente, com concentração inicial de substrato de $180,0 \text{ g.L}^{-1}$ e concentração inicial de células viáveis (C_{VX0}) de $12,0 \text{ g.L}^{-1}$. O objetivo desses ensaios foi obter os parâmetros cinéticos do modelo utilizado para modelagem, simulação e otimização das fermentações subsequentes em batelada alimentada.

Nesses ensaios, 3,0 g de levedura (em base seca) foram previamente hidratadas em 60 mL de água destilada, com agitação por 20 min a 250 rpm em agitador orbital. A porcentagem

de células viáveis do inóculo foi em torno de 75%. Um volume de 140 mL de meio de cultura (mosto) foi adicionado ao Erlenmeyer dando início às fermentações em batelada. Amostras de 2 mL foram retiradas a cada 1 h para determinação das concentrações de etanol, substrato e de células viáveis até o término dos ensaios caracterizados pela exaustão do substrato.

4.3.2. Fermentações em batelada alimentada

Primeiramente, quatro fermentações em batelada alimentada (BA1, BA2, BA3 e BA4) foram realizadas nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente, com concentração total de substrato alimentado de 180,0 g.L⁻¹ e inóculo com concentração de células viáveis (C_{VX0}) de 30,0 g.L⁻¹. As fermentações em BA tiveram o objetivo de validar o modelo e os parâmetros cinéticos obtidos nas fermentações descontínuas, bem como servir de controle para comparação com as fermentações em BA realizadas com altas concentrações de substrato na alimentação do mosto.

Outras quatro fermentações em batelada alimentada (BA5, BA6, BA7 e BA8) foram realizadas nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente, com $C_{VX0}=30,0$ g.L⁻¹ e altas concentrações de substrato, para avaliar as produtividades e as concentrações de etanol no vinho ao final dos ensaios. A concentração total de substrato alimentado (C_{SA}) em cada experimento foi calculada com base na concentração máxima de etanol ($C_{E_{max}}$) e no coeficiente de rendimento em etanol ($Y_{E/S}$) obtidos na etapa de ajuste do modelo para cada temperatura avaliada.

A vazão de alimentação (F) utilizada na fermentação BA4 foi calculada de modo a obter um tempo de enchimento de 5 h, a fim de reproduzir as condições convencionais comumente empregadas nas destilarias brasileiras. A fermentação BA4 foi uma condição “controle”, sendo uma referência para as demais condições avaliadas neste estudo. Nas fermentações BA1-BA3 e BA5-BA8 a vazão de alimentação (F) foi definida pelo algoritmo de otimização.

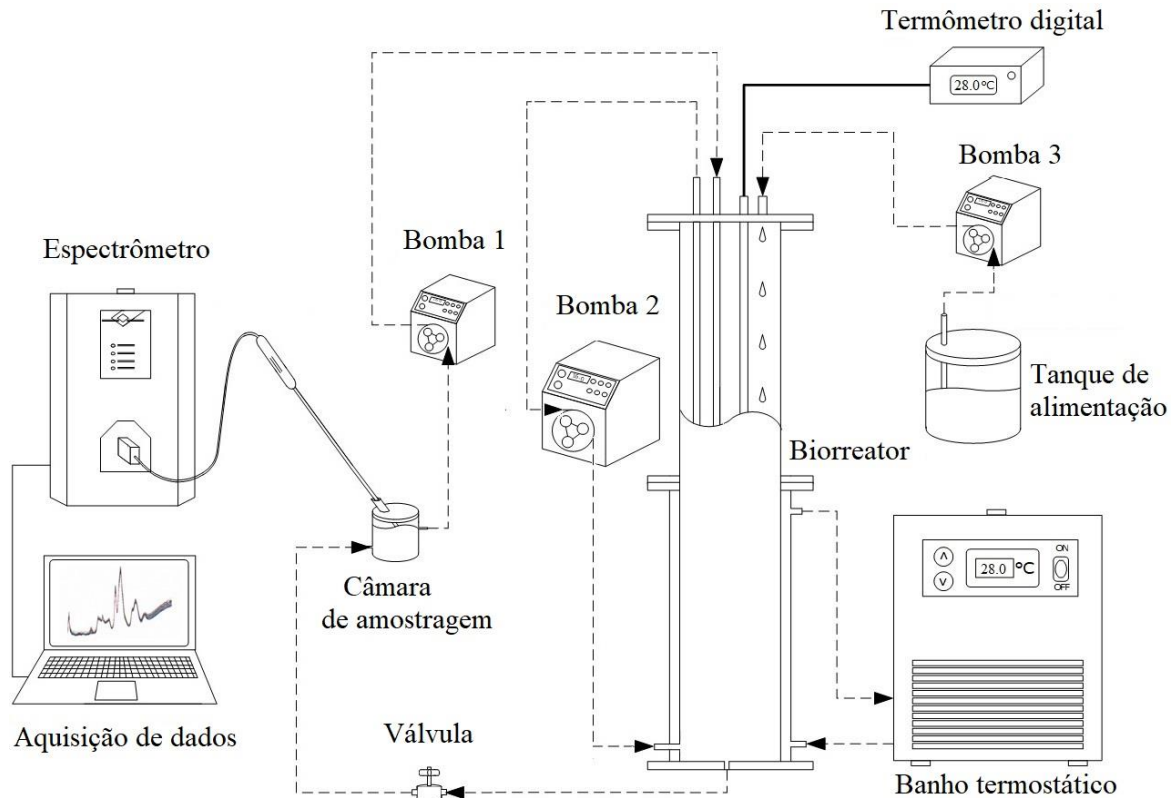
Por fim, foram realizadas fermentações em batelada alimentada com elevada concentração de células viáveis do inóculo e elevada concentração de substrato na alimentação (BA9, BA10, BA11 e BA12), nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente. Essas fermentações foram realizadas para avaliar o aumento da produtividade em etanol. Foram reproduzidas as mesmas condições de operação das fermentações BA5-BA8, modificando-se apenas a concentração celular do inóculo.

A **Figura 10** ilustra o esquema do aparato experimental empregado nas fermentações em BA. Nas fermentações BA1-BA8, uma massa de 30,0 g de levedura (base seca) foi previamente hidratada em 0,6 L (V_0) de água destilada (inóculo correspondente a 30% v.v⁻¹), sob agitação mecânica por 2 min, antes de ser adicionada ao biorreator. Nas fermentações BA9, BA10, BA11 e BA12 foram adicionados 112, 100, 108 e 84 g de levedura (base seca), respectivamente. A porcentagem de células viáveis do inóculo foi em torno de 60% em todas as fermentações em BA. O inóculo não continha nenhum substrato ou etanol ($C_{S0}=C_{E0}=0,0 \text{ g.L}^{-1}$). Antes de iniciar a alimentação do mosto, a suspensão de células foi aclimatada por 20 min sob circulação promovida por bomba peristáltica (Modelo BVP, Ismatec – Bomba 2 na **Figura 10**) a uma vazão de $1,0 \text{ L.min}^{-1}$, que garantiu também a homogeneização do caldo de fermentação. Um volume de 1,4 L de mosto foi então alimentado à vazão volumétrica constante (F) através de bomba peristáltica (Modelo 120 U, Watson-Marlow – Bomba 3 na **Figura 10**), até atingir o volume total de trabalho (2 L). Como a vazão de alimentação do mosto foi constante, o volume do caldo (V) aumentou linearmente com o tempo, conforme a **Equação 19**.

$$V = V_0 + F \cdot t \quad (19)$$

onde V_0 é o volume inicial (L), F é a vazão de alimentação do mosto (L.h^{-1}) e t é o tempo (h).

Quando necessário, antiespumante comercial (Qualifoam, diluído a 30% m.m⁻¹) foi adicionado para reduzir a formação excessiva de espuma. A temperatura foi controlada pela recirculação da água de um banho termostático através da camisa do biorreator, com monitoramento por meio de um termômetro digital (HI 147-00, Hanna Instruments). As concentrações de etanol e substrato (ART) foram determinadas por espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR, *Fourier transform mid-infrared*). Para isso, uma sonda de fibra óptica foi imersa em uma câmara de amostragem, através da qual o caldo de fermentação foi constantemente recirculado utilizando uma bomba peristáltica (Modelo 323 Dz, Watson-Marlow – Bomba 1 na **Figura 10**) à vazão de $60,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Amostras de 5 mL foram retiradas periodicamente para determinação das concentrações de células totais e viáveis.

Figura 10 – Esquema experimental das fermentações em batelada alimentada.

Fonte: acervo pessoal do autor.

4.4. Métodos analíticos

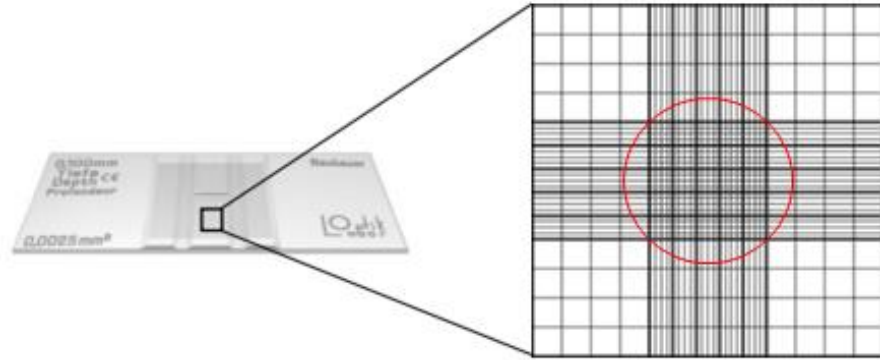
4.4.1. Determinação da concentração de células viáveis

Em todas as fermentações, as concentrações de células viáveis (C_{VX}) foram determinadas pela multiplicação da concentração celular total (C_X), obtida em base seca (método gravimétrico), pela porcentagem de células viáveis, obtida pela contagem de células vivas e mortas (viabilidade celular). Para determinação de C_X pelo método gravimétrico, as amostras foram centrifugadas a $3720 \times g$ (9000 rpm) e 4 °C por 10 min. O precipitado foi lavado uma vez com água destilada e seco a 80 °C por 24 h, seguido de pesagem do sedimento seco de modo a obter a concentração total de células.

A viabilidade celular foi determinada usando o método de coloração com azul de metileno (LEE et al., 1981). Uma alíquota do caldo fermentativo foi retirada do biorreator, diluída em 1 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,1 M, seguida de homogeneização por 1 min e deixada em descanso por mais 1 min. Em seguida adicionou-se 1 mL de solução de azul de metileno e citrato de sódio, homogeneizou-se por 1 min e a amostra foi deixada em descanso por 5 min.

Após o preparo da amostra pelo método de coloração com azul de metileno, uma alíquota foi colocada em uma câmara de Neubauer (Bright Line, Boeco, Germany). A área central da câmara de Neubauer onde a contagem foi realizada é formada por 25 quadrados de 0,2 mm de lado, como mostra a **Figura 11**.

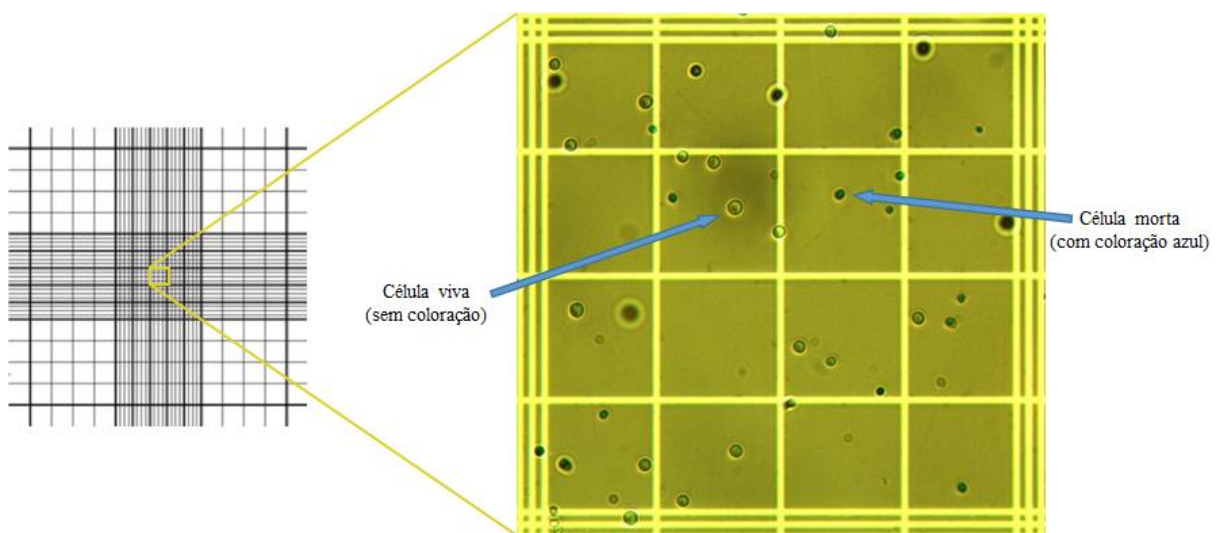
Figura 11 – Câmara de Neubauer com área central destacada.



Fonte: adaptado de Barga (2007).

O corante azul penetra nas células mortas, uma vez que a membrana celular não possui mais atividade, deixando-as azuladas, enquanto as células vivas permanecem incolor. Utilizando um microscópio óptico (BX 50F-3, Olympus) foi possível realizar a contagem de células vivas e mortas. A **Figura 12** mostra um dos quadrantes da área central da câmara de Neubauer, onde é possível diferenciar as células vivas das mortas.

Figura 12 – Quadrante da câmara de Neubauer com células vivas e mortas.



Fonte: acervo pessoal do autor.

4.4.2. Determinação das concentrações de substrato (C_S) e etanol (C_E)

Nas fermentações em batelada alimentada, as concentrações de etanol e de substrato (ART) foram determinadas por espectroscopia FT-MIR, utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) para calibração multivariada, de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues et al. (2018a). Um espectrômetro equipado com uma sonda de fibra óptica (ReactIR 45m, Mettler-Toledo AutoChem) foi usado para realizar as medições. Os espectros foram coletados na faixa de 3000 a 15000 nm (256 varreduras por amostra, com uma resolução de 4,2 nm), a cada 20 minutos durante as fermentações.

O *software* IC IR v. 4.3.35 SP1 (Mettler-Toledo AutoChem) foi usado para aquisição e pré-processamento dos dados, bem como para análise de desempenho dos modelos PLS. As faixas espectrais usadas para obter os modelos de calibração foram 8970–9820 nm para etanol e 8470–10990 nm para ART (essas regiões continham as bandas de absorção características dos analitos). A calibração foi feita a partir dos dados das fermentações BA1, BA5, BA6 e BA7. Esse conjunto de dados cobriu toda a faixa das fermentações realizadas neste trabalho.

Nas fermentações em batelada (B1–B4) e batelada alimentada usadas para calibração multivariada (BA1, BA5, BA6 e BA7), as concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol nos sobrenadantes foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*, Waters, Alliance 2695, USA), empregando um cromatógrafo equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Sugar-Pak I (300×6,5 mm, 10 μ m, Waters) operada a 80 °C. O eluente utilizado foi água ultrapura, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹. Soluções de sacarose, glicose, frutose e etanol em concentrações entre 0,1 e 8,0 g.L⁻¹ foram usadas como padrões (RODRIGUES et al., 2018b).

4.5. Modelagem matemática

A modelagem matemática das fermentações em batelada e em batelada alimentada utilizou quatro equações diferenciais (**Equações 20 – 23**) obtidas a partir dos balanços de massa para células viáveis (VX), etanol (E) e substrato (S), considerando a geração de etanol associado ao crescimento celular e variação do volume (V). Nas fermentações em batelada (B1–B4), a vazão de alimentação do mosto (F) foi igual a zero. As fermentações em batelada alimentada (BA1–BA8) envolveram duas etapas: a alimentação de mosto (F≠0) e a etapa de batelada (F=0), como na condição industrial.

$$\frac{dC_{VX}}{dt} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot C_{VX} \quad (20)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = (C_{SM} - C_S) \cdot \frac{F}{V} - \frac{1}{Y_{VX/S}} \cdot \mu \cdot C_{VX} \quad (21)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{VX/S}} \cdot \mu \cdot C_{VX} - \frac{F}{V} \cdot C_E \quad (22)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (23)$$

onde μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}), C_{VX} é a concentração de células viáveis ($g.L^{-1}$), C_S é a concentração de substrato limitante (ART, $g.L^{-1}$), C_E é a concentração de etanol ($g.L^{-1}$), C_{SM} é a concentração de substrato no mosto ($g.L^{-1}$), $Y_{VX/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células viáveis ($g_{VX}.g_S^{-1}$), e $Y_{E/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($g_E.g_S^{-1}$).

O crescimento celular foi representado pelo modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel (ANDREWS, 1968; LEVENSPIEL, 1980), que considera a inibição por substrato e produto (**Equação 24**).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{Emax}} \right)^n \quad (24)$$

onde μ_{max} é velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação ($g.L^{-1}$), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g.L^{-1}$), C_{Emax} é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular ($g.L^{-1}$) e n é a constante adimensional relacionada ao potencial tóxico do produto.

Nas fermentações em batelada, os coeficientes de rendimento de substrato a células viáveis e etanol ($Y_{VX/S}$ e $Y_{E/S}$) foram determinados usando as **Equações 25 e 26**.

$$Y_{VX/S} = \frac{C_{VXf} - C_{VX0}}{C_{S0} - C_{Sf}} \quad (25)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_{E_f} - C_{E_0}}{C_{S_0} - C_{S_f}} \quad (26)$$

onde os subscritos "0" e "f" referem-se aos tempos inicial e final, respectivamente.

Os coeficientes de rendimento global de substrato a células viáveis e a etanol ($Y_{VX/S}$ e $Y_{E/S}$) nas fermentações em BA foram calculados pelas seguintes equações:

$$Y_{VX/S} = \frac{C_{VX_f} \cdot V_f - C_{VX_0} \cdot V_0}{(V_f - V_0) \cdot C_{SM} - C_{S_f} \cdot V_f} \quad (27)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_{E_f} \cdot V_f}{(V_f - V_0) \cdot C_{SM} - C_{S_f} \cdot V_f} \quad (28)$$

onde os subscritos "0" e "f" referem-se aos tempos inicial e final, respectivamente.

4.6. Procedimento de estimativa dos parâmetros cinéticos

A partir dos dados experimentais e dos valores de $Y_{E/S}$ e $Y_{VX/S}$, os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews-Levenspiel (μ_{max} , K_S , K_{IS} , C_{Emax} e n) foram estimados usando o algoritmo genético juntamente com o algoritmo de Runge-Kutta, a fim de resolver o conjunto de equações diferenciais (**Equações 20–22**, considerando $F=0$) para cada fermentação em batelada. O algoritmo utilizou o pacote “*optim_ga*” do *software* Scilab v. 6.0.1, conforme mostrado no pseudocódigo no **APÊNDICE I**. A minimização da soma dos quadrados dos resíduos (SQR) foi usada como critério para encontrar o melhor ajuste entre os valores calculados e experimentais (função objetivo). Os parâmetros do algoritmo genético utilizado no ajuste do modelo aos dados experimentais estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Parâmetros do algoritmo genético empregado no estudo.

Parâmetros do algoritmo	Valores
Número de indivíduos da população	100
Probabilidade de cruzamento	0,7
Probabilidade de mutação	0,1
Número de gerações	20

Fonte: acervo pessoal do autor.

4.7. Otimização das fermentações em batelada alimentada

A fim de encontrar os valores ótimos da vazão de alimentação do mosto (F) que maximizasse a produtividade volumétrica em etanol (P_E , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), nas fermentações em batelada alimentada BA1–BA3 e BA5–BA8 foi utilizada uma rotina de otimização computacional para maximizar a função objetivo (J), definida como a produtividade volumétrica em etanol (P_E), calculada pela razão entre a concentração de etanol no final da fermentação (C_{Ef}) e o tempo total do processo (t_T). O pseudocódigo do programa para otimização da vazão de alimentação (F) em cultivos em batelada alimentada encontra-se no **APÊNDICE II**.

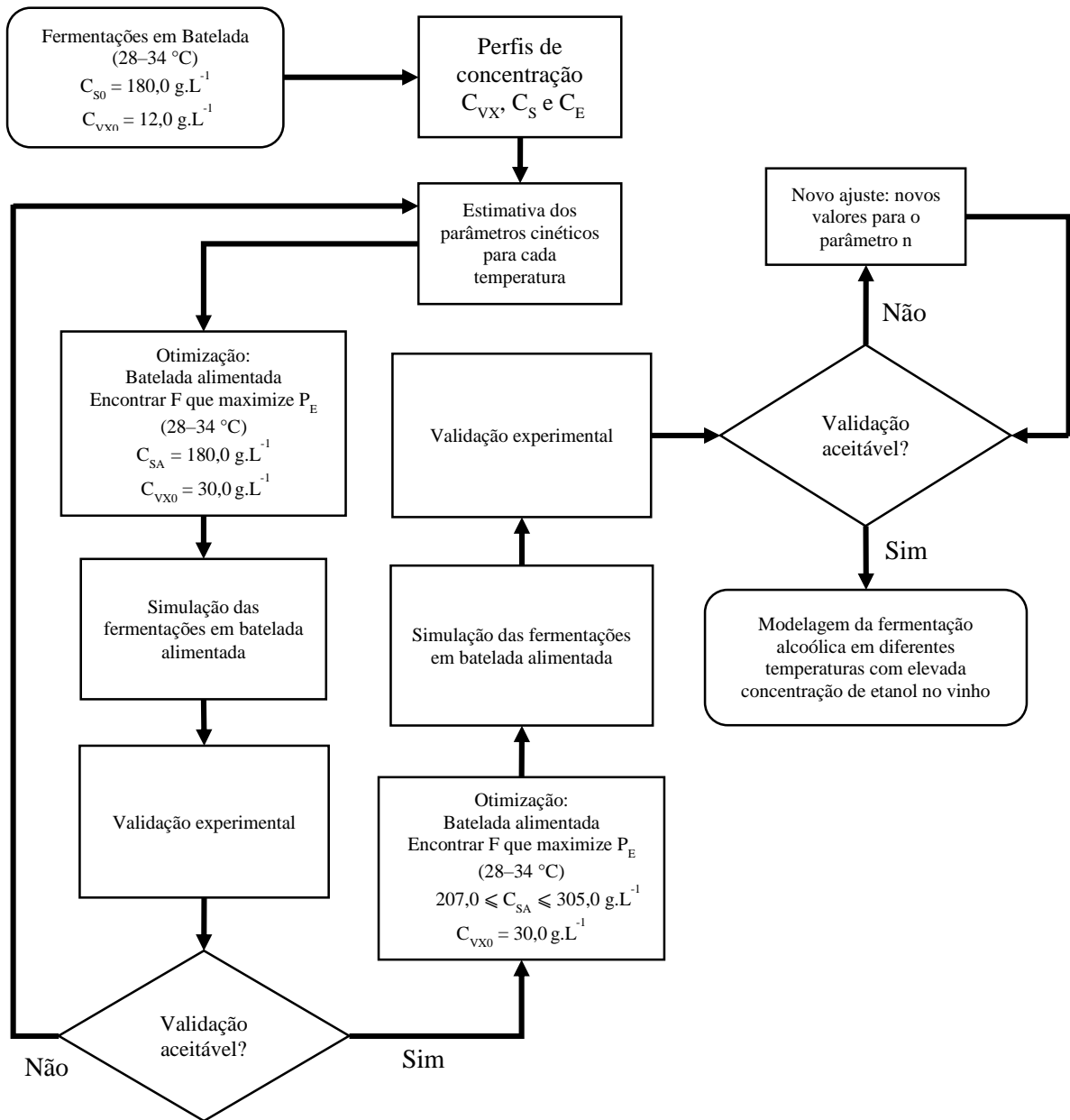
A função objetivo a ser maximizada é dada pela **Equação 29**.

$$J = \max(P_E = C_{Ef}/t_T) \quad (29)$$

A otimização foi realizada utilizando um algoritmo genético (GA) que interagiu com o ajuste da função objetivo (J), ajustando a vazão de alimentação do mosto (F). O procedimento de otimização foi realizado com o *software* Scilab (SONEGO et al., 2018). Os valores dos parâmetros do algoritmo genético utilizado na solução do problema de otimização foram os mesmos utilizados no ajuste do modelo aos dados experimentais (**Tabela 2**).

A **Figura 13** mostra o método utilizado para a modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada em diferentes temperaturas com alta concentração de substrato na alimentação.

Figura 13 – Diagrama de blocos para modelagem e otimização das fermentações em batelada alimentada a partir de parâmetros cinéticos estimados em batelada.



Fonte: acervo pessoal do autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fermentação em batelada: ajuste do modelo e determinação de parâmetros cinéticos

A **Tabela 3** mostra os valores dos parâmetros para as fermentações em batelada com $C_{S0}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{VX0}=12,0 \text{ g.L}^{-1}$. Pode-se observar que o coeficiente de rendimento em células viáveis ($Y_{VX/S}$) diminuiu com o aumento da temperatura, como relatado em outros estudos de fermentação alcoólica a baixa temperatura (ALDIGUIER et al., 2004). O coeficiente de rendimento em etanol ($Y_{E/S}$), a constante de inibição pelo substrato (K_{IS}) e o parâmetro n permaneceram constantes com a mudança de temperatura, corroborando com a literatura (ALDIGUIER et al., 2004; PHISALAPHONG et al., 2006).

Tabela 3 – Condições experimentais e parâmetros cinéticos das fermentações em batelada em diferentes temperaturas com $C_{S0}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Fermentações em Batelada				
Parâmetros	B1	B2	B3	B4
T (°C)	28	30	32	34
$Y_{VX/S}$ (g _{VX} .g _S ⁻¹)	0,0622±0,0021	0,0588±0,0011	0,0509±0,0002	0,0418±0,0030
$Y_{E/S}$ (g _E .g _S ⁻¹)	0,446±0,002	0,445±0,003	0,449±0,007	0,448±0,004
μ_{max}^a (h ⁻¹)	0,157±0,002	0,177±0,002	0,195±0,002	0,220±0,002
K_S^a (g.L ⁻¹)	19,98±1,54	21,72±2,47	40,13±2,35	78,55±2,75
K_{IS}^a (g.L ⁻¹)	170,0±4,7	170,7±7,2	170,2±6,3	170,5±7,5
$C_{E_{max}}^a$ (g _E .L ⁻¹)	139,7±5,5	119,2±32,4	105,0±22,6	93,8±27,8
n ^a (-)	0,125±0,037	0,122±0,032	0,128±0,035	0,119±0,031
C_{Ef} (g.L ⁻¹)	76,6	80,2	80,5	79,2
P_E (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	8,51	8,91	10,01	10,56
% VX _i – % VX _f	75,0 – 80,3	72,0 – 80,1	74,1 – 79,2	75,1 – 78,0

^a Valores estimados com 90% de confiança (teste t de Student); valores de $Y_{VX/S}$ e $Y_{E/S}$ são expressos como média com desvio padrão; P_E : produtividade volumétrica em etanol; % VX_i–% VX_f: valores em porcentagem de células viáveis inicial e final, respectivamente.

Fonte: acervo pessoal do autor.

Os parâmetros μ_{\max} , $C_{E_{\max}}$ e K_S foram dependentes da temperatura. Para cada parâmetro foi ajustada uma equação com altos coeficientes de correlação (R^2) mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Equações ajustadas para μ_{\max} , $C_{E_{\max}}$ e K_S em função da temperatura.

Parâmetros	Equação	R^2
μ_{\max} (h^{-1})	$(4,05 \pm 1,14) \cdot 10^6 \cdot e^{-\frac{(5139,19 \pm 161,01)}{T(K)}}$	0,997
$C_{E_{\max}}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$(138,45 \pm 1,68) \cdot e^{-(1,88 \pm 0,11) \cdot \left(\frac{T(^{\circ}\text{C})-28}{28}\right)}$	0,991
K_S ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$(14,35 \pm 1,92) \cdot e^{(7,64 \pm 0,7) \cdot \left(\frac{T(^{\circ}\text{C})-28}{28}\right)}$	0,98

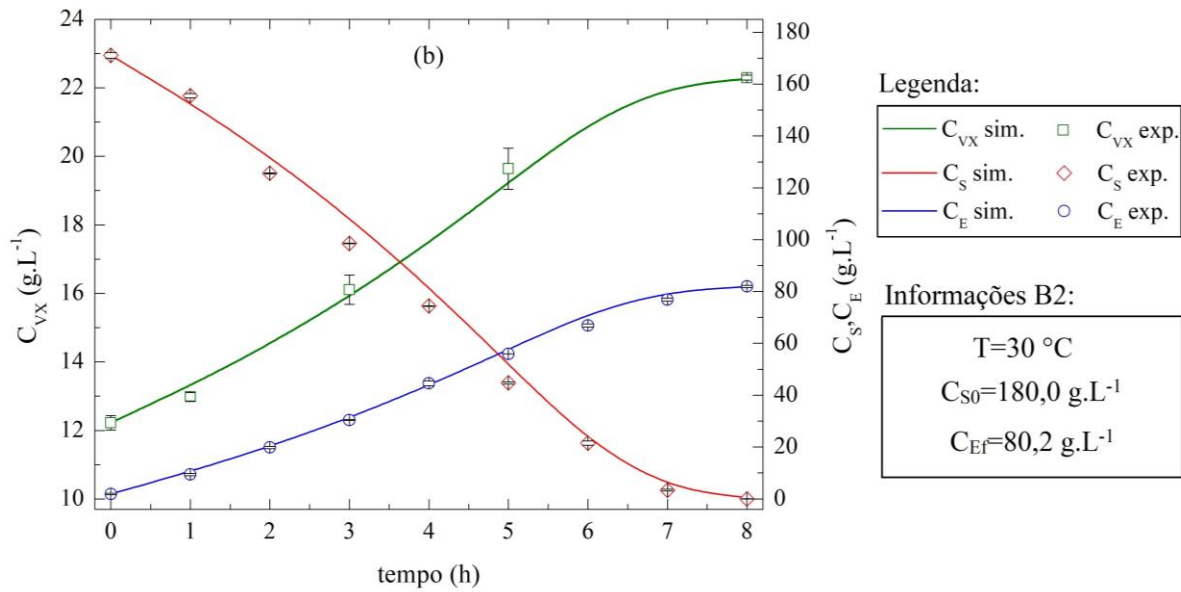
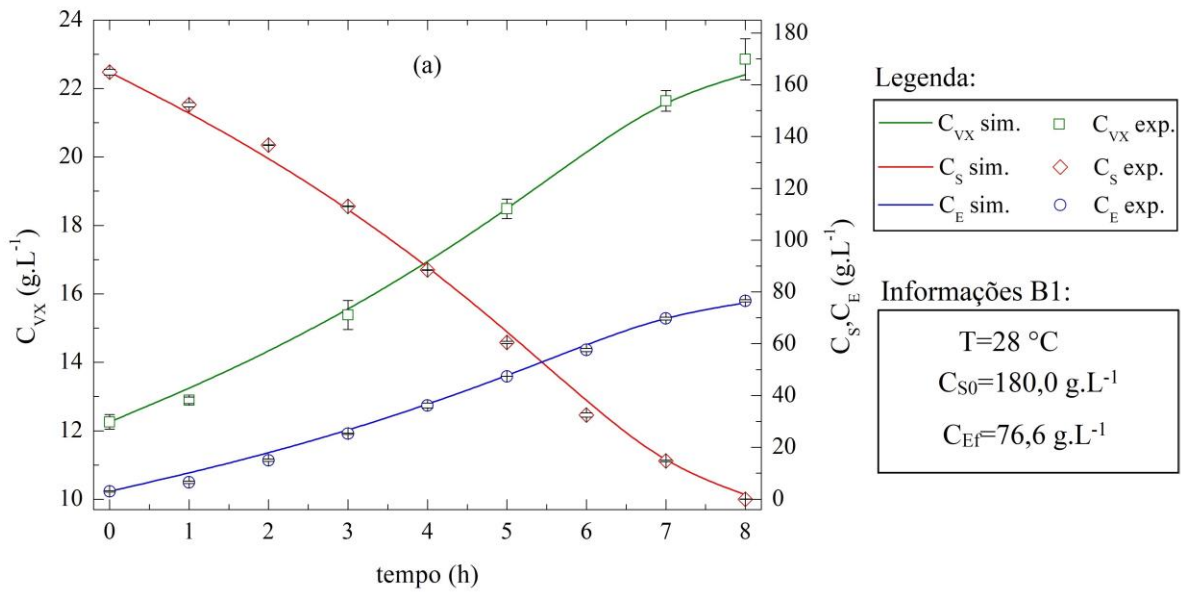
Fonte: acervo pessoal do autor.

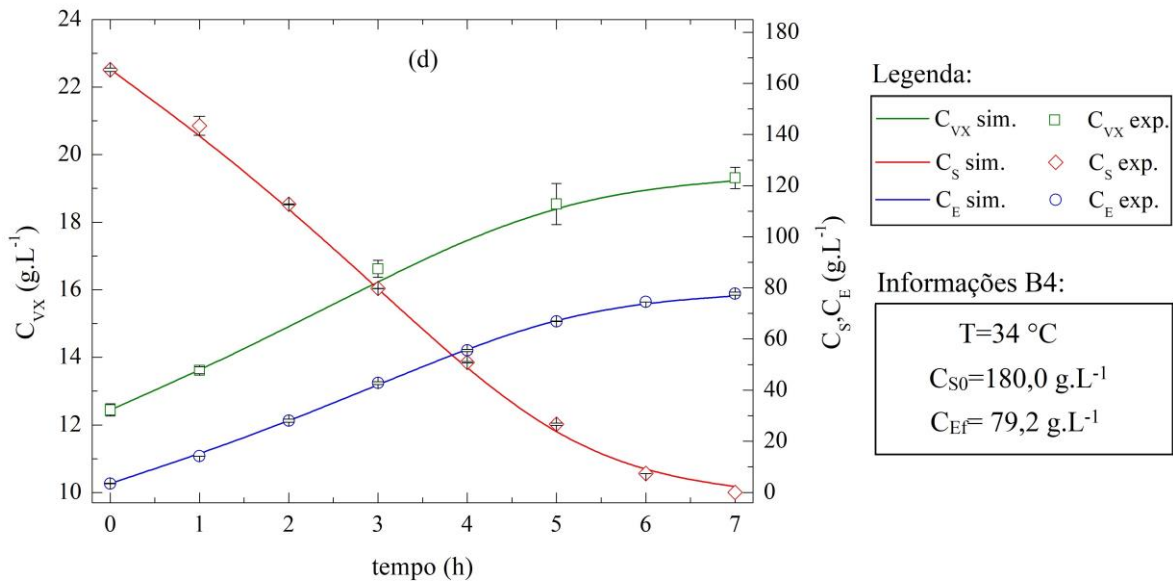
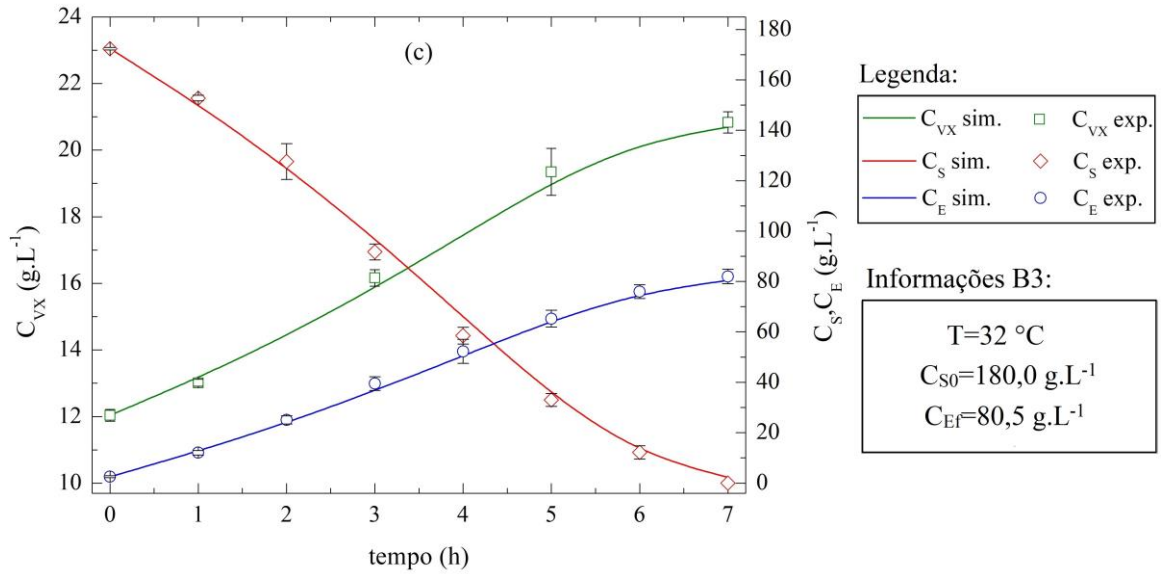
A constante de saturação (K_S), também conhecida como constante de afinidade, aumentou com o aumento da temperatura, mesma tendência observada para outros microrganismos em diferentes estudos (KNOWLES et al., 1965; TOPIWALA e SINCLAIR, 1971; WESTERMANN et al., 1989). Valores baixos de K_S indicam alta afinidade da levedura pelo substrato. Westermann et al. (1989) estudaram o efeito da temperatura na afinidade de *Methanosarcina barkeri* por acetato e hidrogênio e atribuíram maior afinidade do microrganismo pelo substrato à maior capacidade das enzimas de se ligar ao substrato quando a temperatura é reduzida.

Valores mais baixos de $C_{E_{\max}}$ foram observados com o aumento de temperatura, devido à maior sensibilidade da levedura ao etanol em temperaturas mais altas, resultante do aumento da fluidez da membrana celular (PHISALAPHONG et al., 2006; DEED et al., 2015). Efeito oposto foi observado para a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{\max}), que aumentou exponencialmente com a temperatura de acordo com a equação de Arrhenius, como observado em outros estudos (RIVERA et al., 2006; DAI et al., 2013). O ajuste da equação de Arrhenius aos dados experimentais de μ_{\max} em função da temperatura (**Tabela 4**) resultou em uma energia de ativação para o crescimento de leveduras de $10,19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, valor dentro da faixa encontrada na literatura ($10\text{--}20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) (SHULER e KARGI, 2002).

A **Figura 14** (a)–(d) mostra os dados de concentrações de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo do tempo, nas fermentações em batelada realizadas a 28, 30, 32 e 34 °C (B1, B2, B3 e B4, respectivamente). A comparação entre os dados simulados e experimentais mostrou que para todas as temperaturas estudadas o modelo forneceu excelentes ajustes aos dados experimentais.

Figura 14 – Valores simulados (–) e experimentais (símbolos) de concentração de substrato ao longo das fermentações em batelada: (a) B1 (28 °C), (b) B2 (30 °C), (c) B3 (32 °C) e (d) B4 (34 °C). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.





Fonte: acervo pessoal do autor.

5.2. Fermentações em batelada alimentada: validação da modelagem

Os parâmetros cinéticos obtidos nas fermentações descontínuas (**Tabela 3**) foram utilizados em uma rotina de otimização para determinar os valores das vazões de alimentação do mosto (F) que maximizariam as produtividades volumétricas em etanol (P_E , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). O valor de F na fermentação em batelada alimentada a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BA4) foi fixado em $0,280\text{ L.h}^{-1}$, a fim de reproduzir as condições utilizadas na indústria (BASSO et al., 2011).

Os valores de F nas fermentações BA1, BA2, BA3 e BA4 conduzidas a 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente, foram empregados em conjunto com os parâmetros cinéticos obtidos nas fermentações em batelada (**Tabela 3**), a fim de simular os comportamentos das fermentações em BA com $C_{VX0}=30,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$ (concentração total de substrato alimentado) para cada temperatura. Como o volume de mosto alimentado foi de 1,4 L (70% do volume útil), o tempo de enchimento (t_E em h) pode ser calculado a partir da vazão de alimentação do mosto (F) pela relação $t_E=1,4/F$.

Na etapa seguinte, as fermentações em BA foram realizadas para validar a modelagem matemática. A **Tabela 5** contém os valores de F das fermentações, bem como os principais resultados obtidos.

Tabela 5 – Principais informações dos cultivos em batelada alimentada com $C_{SA}=180 \text{ g.L}^{-1}$.

Fermentações em Batelada Alimentada				
Parâmetros	BA1	BA2	BA3	BA4*
T (°C)	28	30	32	34
F (L.h⁻¹)	0,179	0,227	0,258	0,280
t_E (h)	7,82	6,17	5,42	5,00
Y_{VX/S} (g_{VX}.g_S⁻¹)	0,0598±0,0028	0,0553±0,0023	0,0456±0,0002	0,0381±0,0018
Y_{E/S} (g_E.g_S⁻¹)	0,455±0,006	0,452±0,008	0,447±0,005	0,458±0,002
C_{Ef} (g_E.L⁻¹)	82,0	82,1	80,5	81,2
C_{Ef} (°GL)	10,4	10,4	10,2	10,3
P_E (g_E.L⁻¹.h⁻¹)	7,94	8,49	9,29	10,15
%VX_i – %VX_f	58,2 – 72,9	58,5 – 69,3	57,2 – 68,0	59,0 – 61,0

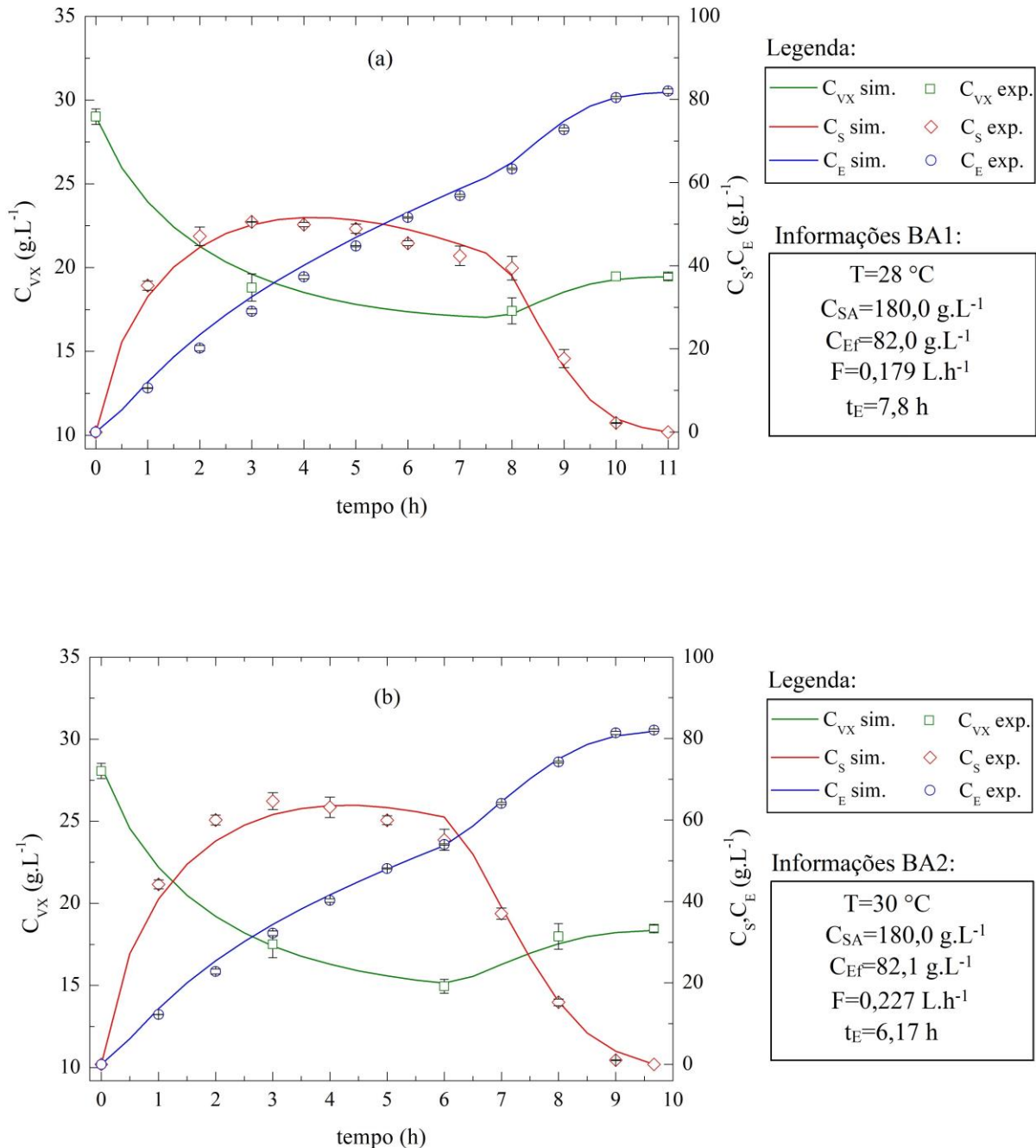
*Fermentação convencional conduzida em condições industriais, utilizada como comparação com as demais fermentações; valores de $Y_{VX/S}$ e $Y_{E/S}$ são expressos como média com desvio padrão; P_E : produtividade volumétrica em etanol; %VX_i–%VX_f: valores em porcentagem de células viáveis inicial e final, respectivamente.

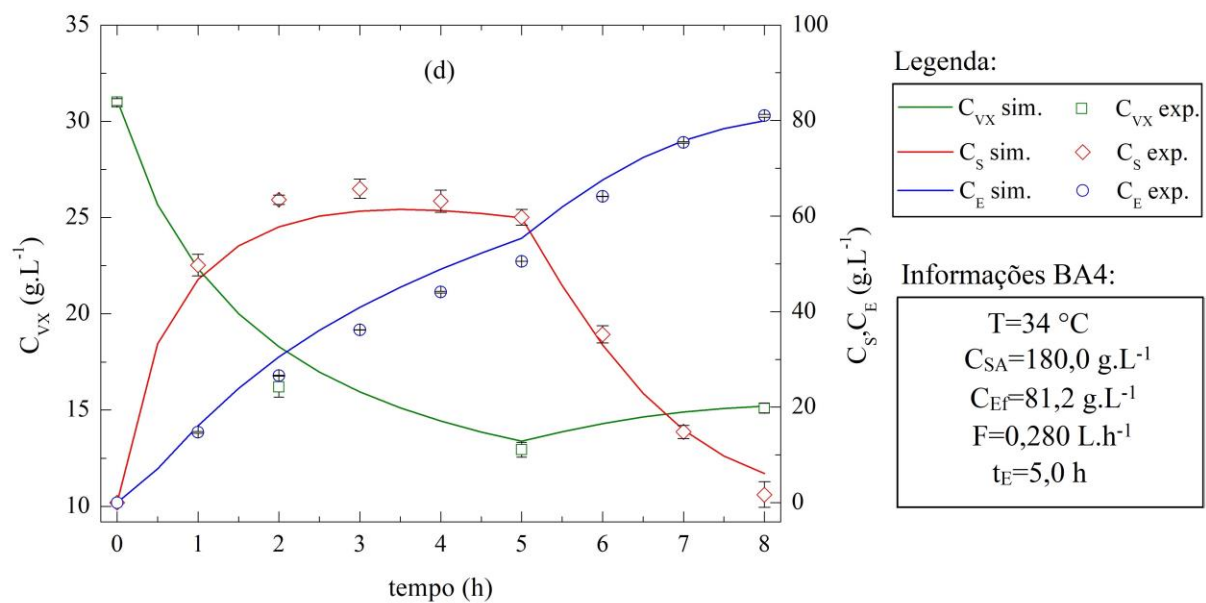
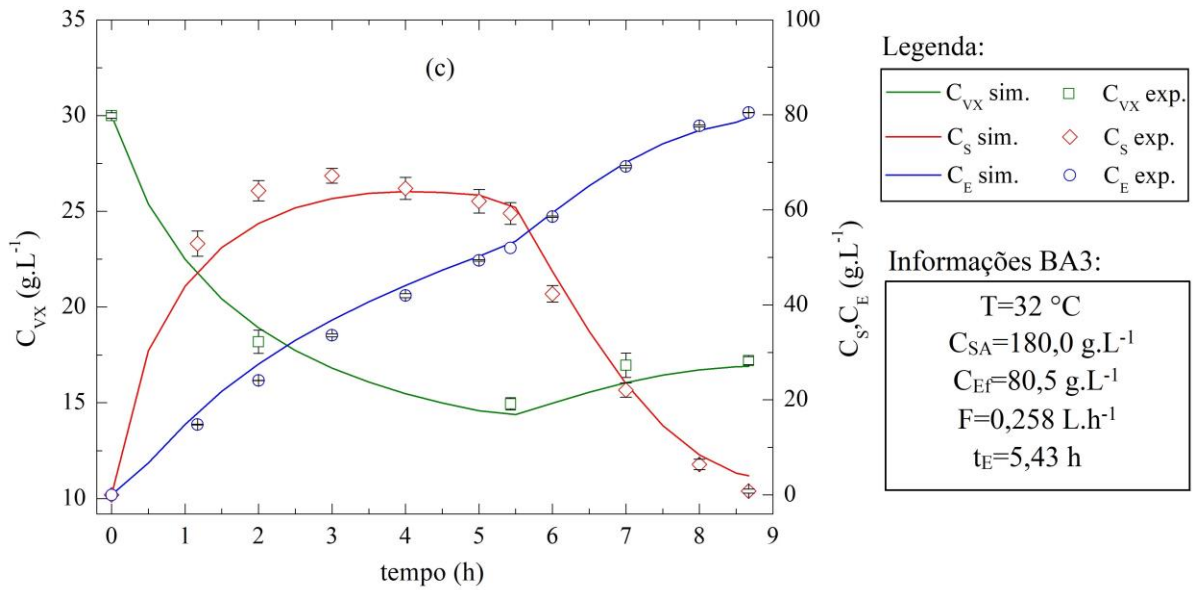
Fonte: acervo pessoal do autor.

A **Figura 15** (a)–(d) mostra a comparação dos valores experimentais (símbolos) e simulados (linhas) de C_S , C_{VX} e C_E obtidos nas fermentações em BA a 28, 30, 32 e 34 °C. O modelo proposto foi capaz de prever satisfatoriamente o comportamento das fermentações

em BA em biorreator de 2 L, utilizando os parâmetros cinéticos obtidos a partir de cultivos em batelada realizados em menor escala (200 mL).

Figura 15 – Valores simulados (–) e experimentais (símbolos) de concentrações de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações BA1, BA2, BA3 e BA4 a (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C, respectivamente, com $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.





Fonte: acervo pessoal do autor.

Os resultados (fermentações BA1–BA4) foram utilizados como referência para avaliação da produção de etanol (concentrações finais de etanol, C_{Ef}) e produtividades em etanol (P_E , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) nas fermentações subsequentes em batelada alimentada (BA5–BA8) realizadas com altas concentrações de substrato.

Salienta-se que as vazões de alimentação do mosto (F) obtidas pela rotina de otimização (**Tabela 5**) foram suficientes para manter as concentrações máximas de substrato no caldo bem abaixo de $150,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ver **Figura 15**), valor em que a inibição pelo substrato é mais pronunciada (THATIPAMALA et al., 1992). Logo, os valores otimizados de F evitaram a inibição pelo substrato maximizando a produtividade em etanol (P_E , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

A técnica FT-MIR utilizada para obtenção de C_S e C_E (**Figura 15**) foi fundamental para determinar o exato momento de término das fermentações (t_T), utilizado no cálculo da produtividade em etanol (P_E), uma vez que os dados foram adquiridos a cada 20 min. Nas fermentações em batelada (**Figura 14**), não foi possível obter um tempo final de fermentação preciso, já que as amostras foram retiradas a cada 1 h para análise por cromatografia (método *off-line*).

A **Tabela 5** mostra os valores de $Y_{E/S}$ e $Y_{VX/S}$ utilizados na modelagem das fermentações em batelada alimentada. Os coeficientes de rendimento de substrato a etanol e a células viáveis não foram expressivamente diferentes dos valores obtidos nas fermentações em batelada. As concentrações finais de etanol (C_{Ef}) obtidas nas fermentações em batelada (B1–B4) e batelada alimentada (BA1–BA4) com $C_{SA}=180 \text{ g.L}^{-1}$ variaram dentro de uma faixa estreita ($76,6\text{--}82,0 \text{ g.L}^{-1}$ ou $9,7\text{--}10,4 \text{ }^\circ\text{GL}$).

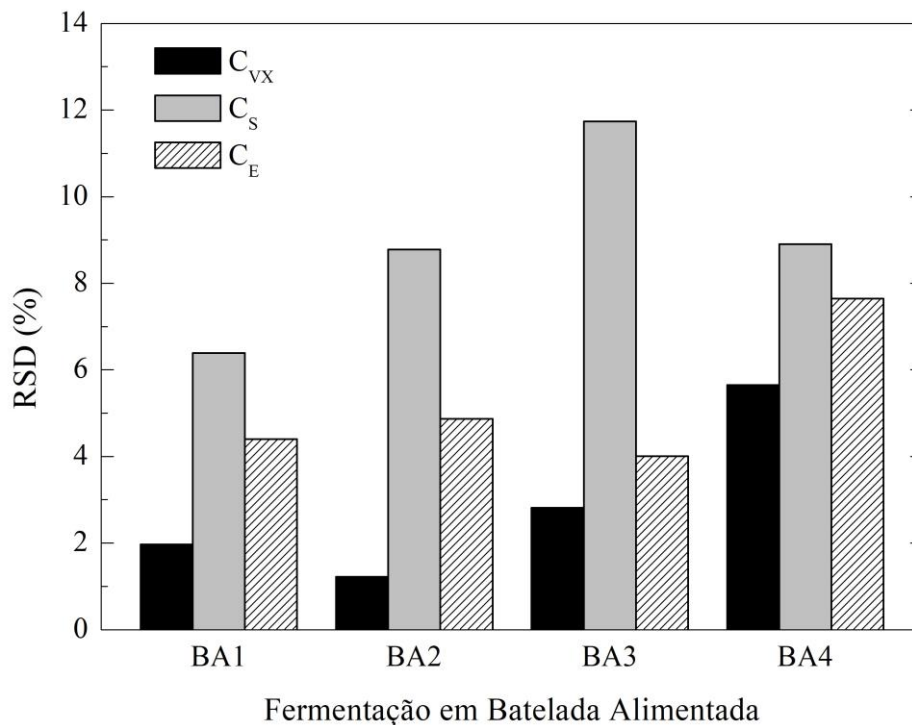
O critério estatístico de desvio padrão residual (RSD, do inglês *residual standard deviation*) proposto por Cleran et al. (1991) foi usado para fornecer uma avaliação mais rigorosa da qualidade de predição do modelo (RIVERA et al., 2017). O RSD é definido pela seguinte equação:

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{j=1}^{N_p} (C_{exp}(t_j) - C_{sim}(t_j))^2}}{\bar{C}_{exp}} \times 100 \quad (30)$$

onde $C_{exp}(t_j)$ é a concentração experimental de células viáveis, de substrato, ou de etanol no tempo t_j ; $C_{sim}(t_j)$ é a concentração prevista pelo modelo no tempo t_j ; \bar{C}_{exp} é a média das concentrações experimentais e N_p é o número de pontos experimentais.

A **Figura 16** mostra os valores de RSD obtidos na avaliação da qualidade de predição do modelo para C_{VX} , C_S e C_E nas fermentações em batelada alimentada com $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$ (BA1–BA4). Os baixos valores de RSD, nas faixas de 6,4–11,7% para o substrato (S), 1,2–5,7% para células viáveis (VX) e 4,0–7,7% para etanol (E), comprovam que o modelo foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento do processo na faixa de temperatura estudada. Esses resultados mostram que os parâmetros cinéticos podem ser usados para representar diferentes modos de operação do processo, como observado em outros trabalhos encontrados na literatura (WESTERMANN et al., 1989; HUANG et al., 2010; KARAPATSIYA et al., 2016; RIVERA et al., 2017).

Figura 16 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações BA1–BA4.



Fonte: acervo pessoal do autor.

O uso de células viáveis (VX) na modelagem contribuiu para a excelente predição do modelo, uma vez que apenas células viáveis consomem substrato e produzem etanol. Cabe salientar que uma tentativa de modelagem considerando a concentração de células totais (C_X) foi realizada. No entanto, o modelo não foi capaz de descrever o comportamento dinâmico das fermentações em BA, como mostrado pelos altos valores de RSD apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações em batelada alimentada BA1–BA4, utilizando células totais.

Valores de RSD para cada concentração			
Fermentação	C _x (%)	C _s (%)	C _E (%)
BA1	6,27	63,73	24,42
BA2	7,75	65,52	30,11
BA3	5,4	38,77	16,94
BA4	4,4	47,26	8,89

Fonte: acervo pessoal do autor.

Como os parâmetros puderam ser correlacionados com a temperatura, as equações da **Tabela 4** foram acopladas ao modelo na rotina de otimização, a fim de encontrar os valores ótimos de temperatura e vazão de alimentação que maximizassem a produtividade em etanol. Os resultados obtidos foram $T=29,32\text{ °C}$ e $F=0,220\text{ L.h}^{-1}$. Esta condição operacional é muito próxima àquela realizada experimentalmente na fermentação BA2 (**Figura 15**–(b)). No entanto, os dados experimentais da fermentação BA4 (34 °C e $F=0,280\text{ L.h}^{-1}$) mostraram que esta condição operacional proporcionou a maior produtividade ($10,15\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Os resultados obtidos pela otimização não indicaram a temperatura de 34 °C como ótima. A razão é que o modelo não previu com precisão o final da fermentação nesta temperatura, valor usado para calcular a produtividade em etanol. Como pode ser visto na **Figura 15**–(d), os valores simulados da concentração de substrato foram superiores que os valores experimentais no final da fermentação. É importante ressaltar que os mesmos parâmetros estimados nas fermentações em batelada foram utilizados para simular as fermentações BA1–BA4. O resultado poderia ser mais preciso se um novo procedimento de ajuste de parâmetros fosse realizado usando os dados experimentais das fermentações em batelada alimentada. No entanto, o objetivo do presente trabalho foi, entre outros, modelar as fermentações em batelada alimentada utilizando os parâmetros cinéticos obtidos a partir de fermentações em batelada.

5.3. Otimização da fermentação em batelada alimentada com alta concentração de substrato

O modelo de Andrews-Levenspiel previu nas diferentes temperaturas as concentrações máximas de etanol que a levedura pode tolerar antes de cessar o crescimento celular ($C_{E_{max}}$). Esta é uma característica útil do modelo, uma vez que $C_{E_{max}}$ é um valor previsto extrapolado que se situa fora do intervalo experimental de concentração de etanol obtido nas fermentações. Os valores de $C_{E_{max}}$ estimados para a faixa de temperatura 28–34 °C são mostrados na **Tabela 3**. Outros estudos experimentais buscam obter esses valores realizando fermentações longas com várias adições de substrato ou com a adição de etanol ao caldo de fermentação (LEVENSPIEL, 1980; D'AMORE e STEWART, 1987).

As etapas a seguir foram realizadas para definir as condições operacionais das fermentações com altas concentrações de substrato visando a obtenção de vinhos altamente concentrados em etanol:

- i) Calcular os valores de concentração total de substrato alimentado (C_{SA}), com base nos valores de $C_{E_{max}}$ e $Y_{E/S}$ obtidos na etapa de modelagem.
- ii) Obter por otimização os valores das vazões de alimentação do mosto (F) que maximizam a produtividade em etanol, para cada condição de temperatura e C_{SA} .
- iii) Realizar fermentações em BA com alta concentração de substrato no mosto ($C_{SM}=C_{SA}/0,70$, com o mosto representando 70% do volume de trabalho), a fim de validar a otimização.

Os parâmetros cinéticos do modelo (**Tabela 3**) foram utilizados para obter os valores otimizados de F e simular as fermentações em BA com altas concentrações de substrato. Para cada temperatura, um valor de C_{SA} foi calculado para obter a concentração máxima de etanol ($C_{E_{max}}$) estimada na etapa de ajuste do modelo (fermentações em batelada). Os valores simulados de C_S , C_{VX} e C_E nas fermentações BA5–BA8 obtidos utilizando os parâmetros cinéticos da **Tabela 3**, mostraram que o modelo não foi capaz de descrever bem o comportamento dinâmico do processo. Valores elevados de RSD foram observados para substrato (S), células viáveis (VX) e etanol (E), mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Valores de RSD obtidos para predição do modelo aplicado nas fermentações em batelada alimentada BA5–BA8.

Valores de RSD para cada concentração			
Fermentação	C _{VX} (%)	C _S (%)	C _E (%)
BA5	11,19	92,78	31,46
BA6	7,14	63,57	25,81
BA7	5,98	68,29	13,57
BA8	3,72	14,47	51,66

Fonte: acervo pessoal do autor.

Uma análise de sensibilidade do parâmetro “n” mostrou que os valores simulados se aproximaram dos experimentais. Este efeito pode ser observado nas figuras no **APÊNDICE III** que mostram os ajustes do modelo aos dados experimentais de concentração de substrato ao longo do tempo para as fermentações BA5-BA8 para diferentes valores do parâmetro “n”. Segundo Levenspiel (1980), “n” é um parâmetro empírico cuja função é apenas dar peso à inibição pelo produto. Diante do observado, novos ajustes do modelo foram realizados fixando-se os parâmetros μ_{\max} , K_S , K_{IS} e $C_{E\max}$ (uma vez que estes demonstraram depender somente da temperatura) e alterando apenas o valor do parâmetro “n”. Este último apresentou variações significativas, sugerindo uma relação deste parâmetro com a quantidade de substrato alimentado (C_{SA}) e, portanto, com a quantidade de etanol produzido (C_{Ef}). A **Tabela 8** mostra as condições experimentais das fermentações BA5–BA8 com alta concentração de substrato no mosto, bem como os valores reestimados do parâmetro “n” e os principais resultados obtidos nas fermentações.

Tabela 8 – Condições experimentais e principais resultados obtidos nas fermentações em batelada alimentada com elevada concentração de substrato na alimentação.

Fermentações em Batelada Alimentada com elevada C_{SA}				
Parâmetros	BA5	BA6	BA7	BA8
T (°C)	28	30	32	34
C_{SA} (gs.L⁻¹)	305,4	262,6	234,2	207,4
F (L.h⁻¹)	0,109	0,155	0,227	0,280
t_E (h)	12,84	9,03	6,17	5,00
Y_{VX/S} (gvx.gs⁻¹)	0,0416±0,0045	0,0452±0,0011	0,0443±0,0012	0,0364±0,0011
Y_{E/S} (ge.gs⁻¹)	0,442±0,002	0,445±0,006	0,443±0,001	0,446±0,008
n^a (-)	0,889± 0,018	0,551±0,018	0,384±0,023	0,211±0,029
C_{Ef} (ge.L⁻¹)	134,7	115,5	103,8	92,2
C_{Ef} (°GL)	17,1	14,6	13,2	11,7
P_E (ge.L⁻¹.h⁻¹)	4,99	6,79	8,19	8,93
A_E (%)	64,4	42,1	29,0	13,6
%VX_i – %VX_f	59,6 – 86,4	62,8 – 75,5	59,9 – 76,2	60,0 – 65,4

^a Valores estimados com 90% de confiança (teste t de Student); valores de Y_{VX/S} e Y_{E/S} são expressos como média com desvio padrão; P_E: produtividade volumétrica em etanol; A_E: aumento percentual de etanol no caldo em relação à condição convencional aplicada nas destilarias brasileiras (BA4); % VX_i–% VX_f: valores em porcentagem de células viáveis inicial e final, respectivamente.

Fonte: acervo pessoal do autor.

Como “n” é um parâmetro do modelo cinético de Andrews-Levenspiel associado ao termo de inibição do produto, foi investigada sua relação com a concentração de etanol no vinho ao final das fermentações. Os diferentes valores de “n” apresentaram relação com valores finais correspondentes de concentração de etanol (C_{Ef}=Y_{E/S}·C_{SA}). O modelo representado pela **Equação 31** apresentou excelente ajuste com R²=0,990.

$$n = (0,143 \pm 0,014) \cdot \left(\frac{C_{Ef}}{80,0}\right)^{3,56 \pm 0,22} \quad (\text{para } C_{Ef} \geq 80,0 \text{ g.L}^{-1}) \quad (31)$$

O efeito inibitório do etanol é mais pronunciado em vinhos com alto teor alcoólico e o parâmetro “n” considera esse efeito no modelo cinético. Segundo Levenspiel (1980), quanto

menor o valor de “n”, menos pronunciada é a inibição pelo produto, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Portanto, o valor de “n” obtido nas fermentações com baixa concentração de etanol no caldo (até 80,0 g.L⁻¹ ~ 10 °GL) não pode ser usado para simular processos com alta concentração de etanol, uma vez que o efeito inibitório do etanol é mais pronunciado apenas em altas concentrações. A correlação proposta permite o cálculo do valor de “n” a partir de concentrações finais de etanol no caldo na faixa de 80,0–135,0 g.L⁻¹ (10–17 °GL), obtido com base na concentração do substrato alimentado e no coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($Y_{E/S}$).

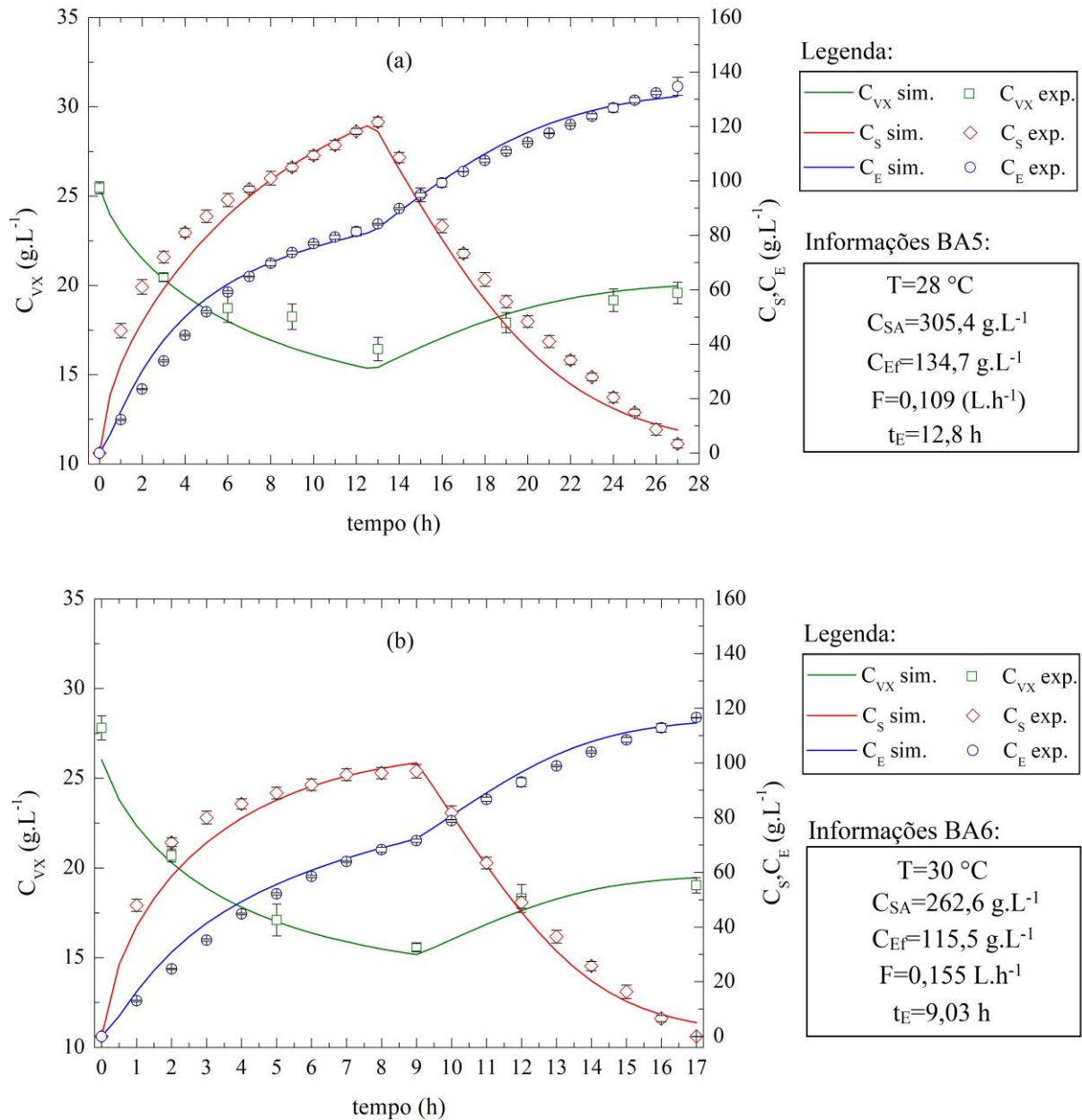
O conhecimento dos efeitos da temperatura e das altas concentrações de etanol nos parâmetros cinéticos permite o uso do modelo em simulações para prever o comportamento dinâmico do processo em diferentes modos de operação, sendo útil na análise e na melhoria de desempenho da fermentação alcoólica. Os novos valores do parâmetro “n” foram utilizados para recalcular valores ótimos de F que maximizaram a produtividade em etanol. Entretanto, os valores de F obtidos não mostraram diferenças significativas, provavelmente porque “n” é um parâmetro relacionado à inibição do produto (etanol), enquanto F está relacionado ao estágio do processo no qual a inibição do substrato é mais pronunciada.

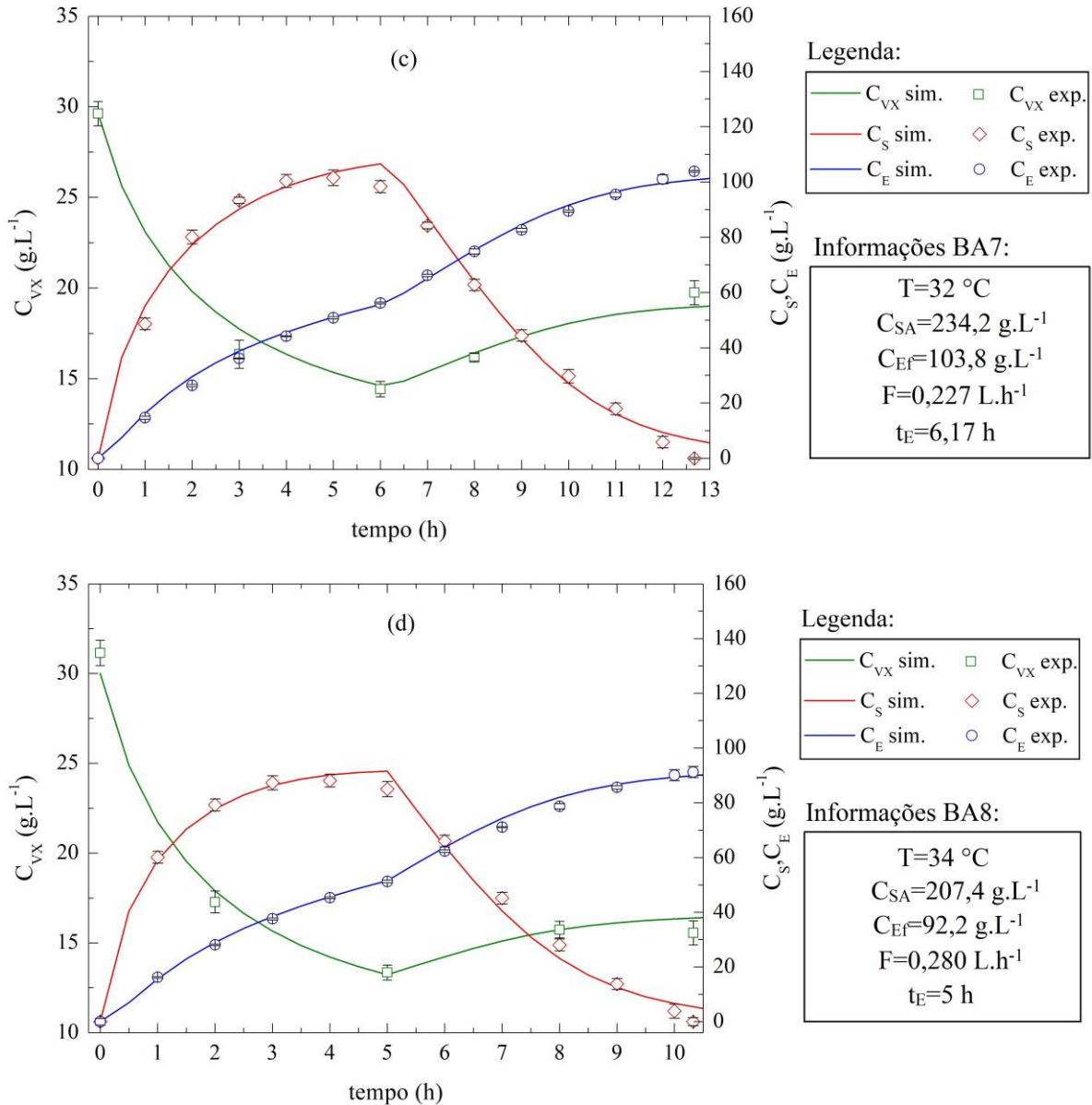
O parâmetro $Y_{E/S}$ não apresentou variação significativa com valores de aproximadamente 0,440 g_E.g_S⁻¹, mostrando que mesmo com o aumento da concentração de substrato e a alta concentração de etanol, a conversão do substrato a etanol não foi afetada. No entanto, foi observada uma variação nos valores de $Y_{VX/S}$ nas fermentações com concentrações totais de substrato alimentado (C_{SA}) superiores a 235,0 g.L⁻¹, BA5 e BA6 em relação à BA1 e BA2, respectivamente. A diminuição de $Y_{VX/S}$ pode ser atribuída às condições estressantes a que o microrganismo foi exposto nesses experimentos. Comportamento semelhante foi relatado por Atala et al. (2001) e foi atribuído às condições de cultivo, incluindo alta concentração de etanol e forças de atrito promovida pela bomba utilizada no reciclo das células. Também foi observado que nas fermentações em que as células de levedura foram submetidas a condições de estresse (BA5–BA8), o coeficiente de rendimento de substrato a células viáveis foi próximo a 0,040 g_{VX}.g_S⁻¹.

A **Figura 17** (a)–(d) mostra a variação com o tempo das concentrações experimentais e simuladas de C_{VX} , C_S e C_E a 28, 30, 32 e 34 °C nas fermentações com altas concentrações de substrato e $C_{VX0}=30,0$ g.L⁻¹ (BA5, BA6, BA7 e BA8). Pode-se observar que o modelo apresentou bom ajuste aos dados experimentais, mostrando que a modelagem melhorada,

considerando a dependência do parâmetro “n” com a concentração final de etanol (C_{Ef}) e, portanto, com a quantidade de substrato alimentado (C_{SA}), foi eficaz para descrever o comportamento das fermentações em BA com altas concentrações de substrato.

Figura 17 – Valores de concentrações simuladas (–) e experimentais (símbolos) de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações em BA com alta concentração de substrato: (a) BA5 (28 °C, $C_{SA}=305,4 \text{ g.L}^{-1}$), (b) BA6 (30 °C, $C_{SA}=262,6 \text{ g.L}^{-1}$), (c) BA7 (32 °C, $C_{SA}=234,2 \text{ g.L}^{-1}$), e (d) BA8 (34 °C, $C_{SA}=207,4 \text{ g.L}^{-1}$). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.





Fonte: acervo pessoal do autor.

Mesmo com a alimentação de altas concentrações de substrato ($305,4\text{--}207,4\text{ g.L}^{-1}$), os valores de F na faixa de $0,109$ a $0,280\text{ L.h}^{-1}$ obtidos na otimização de fermentações em BA nas temperaturas de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BA5) a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BA8) foram suficientes para que a concentração de substrato no caldo permanecesse abaixo de $150,0\text{ g.L}^{-1}$. Isso evitou a inibição do substrato e demonstrou o sucesso do uso do algoritmo genético na otimização do processo.

A **Tabela 8** mostra as produtividades em etanol e os aumentos percentuais da produção de etanol (A_E) das fermentações BA5–BA8 com altas concentrações de substrato, em relação à fermentação BA4 (condição convencional aplicada nas destilarias brasileiras). Um aumento de até $64,4\%$ na produção de etanol em BA5 ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $C_{SA}=305,4\text{ g.L}^{-1}$), em relação à condição

convencional aplicada nas destilarias brasileiras (BA4: 34 °C e $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$) foi possível devido ao aumento da resistência da levedura ao etanol, promovida pela redução da temperatura, dificultando o transporte de substâncias tóxicas para o interior das células (D'AMORE e STEWART, 1987; PHISALAPHONG et al., 2006). O alto teor de etanol no caldo (17,1 °GL) corresponde a uma redução de $0,70 \text{ kg}_{\text{vapor}} \cdot \text{L}_{\text{etanol}}^{-1}$ no estágio de destilação em relação ao vinho com teor de álcool de 10 °GL (fermentação convencional, BA4), o que representa uma economia de energia de 27% (LOPES et al., 2016) e uma redução de $4,0 \text{ L}_{\text{vinhaça}} \cdot \text{L}_{\text{etanol}}^{-1}$, aproximadamente 36% (SONEGO et al., 2018). A vinhaça é usada como fertilizante em plantações de cana-de-açúcar (AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2011), embora haja limitações ambientais, pois as aplicações podem exceder a capacidade do solo de reter íons, bem como restrições econômicas, como os custos de armazenamento e transporte para as plantações (SONEGO et al., 2018).

Na fermentação BA5, o consumo completo do substrato ocorreu após 27 h de fermentação, afetando a produtividade em etanol ($4,99 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, **Tabela 8**). Uma maneira de aumentar a produtividade em etanol (P_E) do processo é aumentar a concentração inicial de células (inóculo). Outra maneira de se aumentar P_E é extrair etanol do processo à medida que o mesmo é produzido, diminuindo assim o efeito inibitório, como relatado em vários estudos (TAYLOR et al., 2010; DIAS et al., 2012; SONEGO et al., 2014; LEMOS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018b). Ainda, em um trabalho recente, Cruz et al. (2018) mostraram que a baixa P_E na fermentação realizada a 24 °C pode ser substancialmente aumentada pela adaptação das células de levedura a 4 °C.

Como a modelagem foi capaz de representar com precisão os comportamentos das fermentações em batelada e batelada alimentada, simulações foram realizadas variando a concentração inicial de células viáveis (C_{VX0}) e alimentando a mesma quantidade de substrato (C_{SA}) das fermentações BA5 a BA8 (28 a 34 °C). As simulações objetivaram o restabelecimento dos níveis de produtividade em etanol (P_E) obtidos nas fermentações com $C_{SA}=180,0 \text{ g.L}^{-1}$ (BA1–BA4). Os valores de C_{VX0} encontrados nas simulações das fermentações em BA a 28, 30, 32 e 34 °C foram 60,0, 45,0, 40,0 e 37,0 g.L^{-1} , respectivamente. As produtividades obtidas pela simulação foram de 6,09, 8,80, 9,09 e 10,01 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para 28, 30, 32 e 34 °C, respectivamente, mostrando que a diminuição da P_E devido à alta concentração de substrato e baixa temperatura poderia ser reestabelecida pelo aumentando a carga inicial de células viáveis (inóculo) no processo.

5.4. Fermentações com aumento da concentração inicial de células viáveis (C_{VX0})

Inicialmente foi realizado o cultivo a 34 °C, com $C_{SA}=207,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{VX0} = 37 \text{ g.L}^{-1}$ a fim de validar a simulação. Para se atingir uma produtividade de $10,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o substrato deveria ser totalmente consumido em aproximadamente 9 h de fermentação, de acordo com a simulação. No entanto, isso não foi observado. A adição de 37 g.L^{-1} de células viáveis não foi suficiente para aumentar a velocidade de consumo de substrato, sendo o tempo final de fermentação de 10 h, mantendo a produtividade em torno de $8,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (a mesma observada na fermentação BA8).

Assim, como o modelo não representou fielmente o processo a 34 °C com o aumento de células viáveis, foi intuitivo considerar que os resultados simulados para as demais temperaturas também não representariam a dinâmica do processo. Decidiu-se então aumentar o valor inicial de células viáveis para avaliar os efeitos nas produtividades. O valor máximo de C_{VX0} foi de $65,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($C_{X0}=110 \text{ g.L}^{-1}$), valor próximo do utilizado nas destilarias (WHEALS, 1999). As condições de cada experimento estão apresentadas na **Tabela 9**.

Observa-se na **Tabela 9** que o aumento da concentração celular do inóculo promoveu aumentos nas produtividades em etanol (P_E), conforme esperado. No entanto, o modelo previu que para reestabelecer as produtividades apresentadas na **Tabela 5** (fermentações BA1–BA4) seriam necessários 60,0, 45,0, 40,0 e 37,0 g.L^{-1} para 28, 30, 32 e 34 ° C, respectivamente. Portanto, concluiu-se que o modelo apresenta limitações quando há alteração na concentração celular do inóculo.

Deve-se levar em conta que o modelo cinético de Andrews-Levenspiel não considera a inibição por células. Os modelos cinéticos encontrados na literatura (ver **Seção 3.8**) incorporam ao modelo de Monod termos de inibição pelo substrato, produto e por células a fim de explicar o comportamento experimental observado em novas condições de cultivo. O modelo híbrido de Andrews/Lee–Pollard–Coulman/Levenspiel considera inibição por células, substrato e produto. No entanto, apresenta dois parâmetros a mais para serem estimados (“m” e C_X^*).

Tabela 9 – Condições experimentais e principais resultados das fermentações em batelada alimentada com elevada concentração de substrato na alimentação e com elevada concentração inicial de células viáveis.

Fermentações em Batelada Alimentada com elevadas C_{SA} e C_{VX0}				
Parâmetros	BA9	BA10	BA11	BA12
T (°C)	28	30	32	34
C_{SA} (g\cdotL$^{-1}$)	308,0	262,6	234,2	207,0
C_{VX0} (g\cdotV\cdotL$^{-1}$)	65,5	57,7	64,9	48,7
F (L\cdoth$^{-1}$)	0,146	0,207	0,233	0,280
$Y_{VX/S}$ (g\cdotV\cdotg\cdotS$^{-1}$)	0,0444	0,0366	0,0407	0,0361
$Y_{E/S}$ (g\cdotE\cdotg\cdotS$^{-1}$)	0,446	0,449	0,440	0,446
C_{Ef} (g\cdotE\cdotL$^{-1}$)	136,12	116,8	102,1	91,6
C_{Ef} (°GL)	17,25	14,8	12,94	11,6
P_E (g\cdotE\cdotL$^{-1}$·h$^{-1}$)	5,44	7,73	9,28	10,18
A_{PE} (%)	8,8	13,8	13,3	14,0
%VX_i – %VX_f	58,4 – 82,3	58,8 – 70,7	60,0 – 72,2	58,3 – 68,2

^a Valores estimados com 90% de confiança (teste t de Student); valores de $Y_{VX/S}$ e $Y_{E/S}$ são expressos como média com desvio padrão; P_E : produtividade volumétrica em etanol; A_{PE} : aumento percentual de produtividade em etanol em relação às fermentações BA5–BA8; % VX_i –% VX_f : valores em porcentagem de células viáveis inicial e final, respectivamente.

Fonte: acervo pessoal do autor.

O modelo de Andrews-Levenspiel representou a dinâmica da fermentação alcoólica para os experimentos com $C_{VX0}=30$ g \cdot L $^{-1}$, porém para fermentações com $C_{VX0}>30$ g \cdot L $^{-1}$ o mesmo não apresentou boa previsão. Para ajustar o modelo de Andrews-Levenspiel aos dados experimentais com $C_{VX0}>30$ g \cdot L $^{-1}$ foi necessário uma modificação dos parâmetros do modelo, mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Novos valores dos parâmetros cinéticos obtidos no ajuste do modelo aos valores experimentais das fermentações com elevada concentração celular inicial.

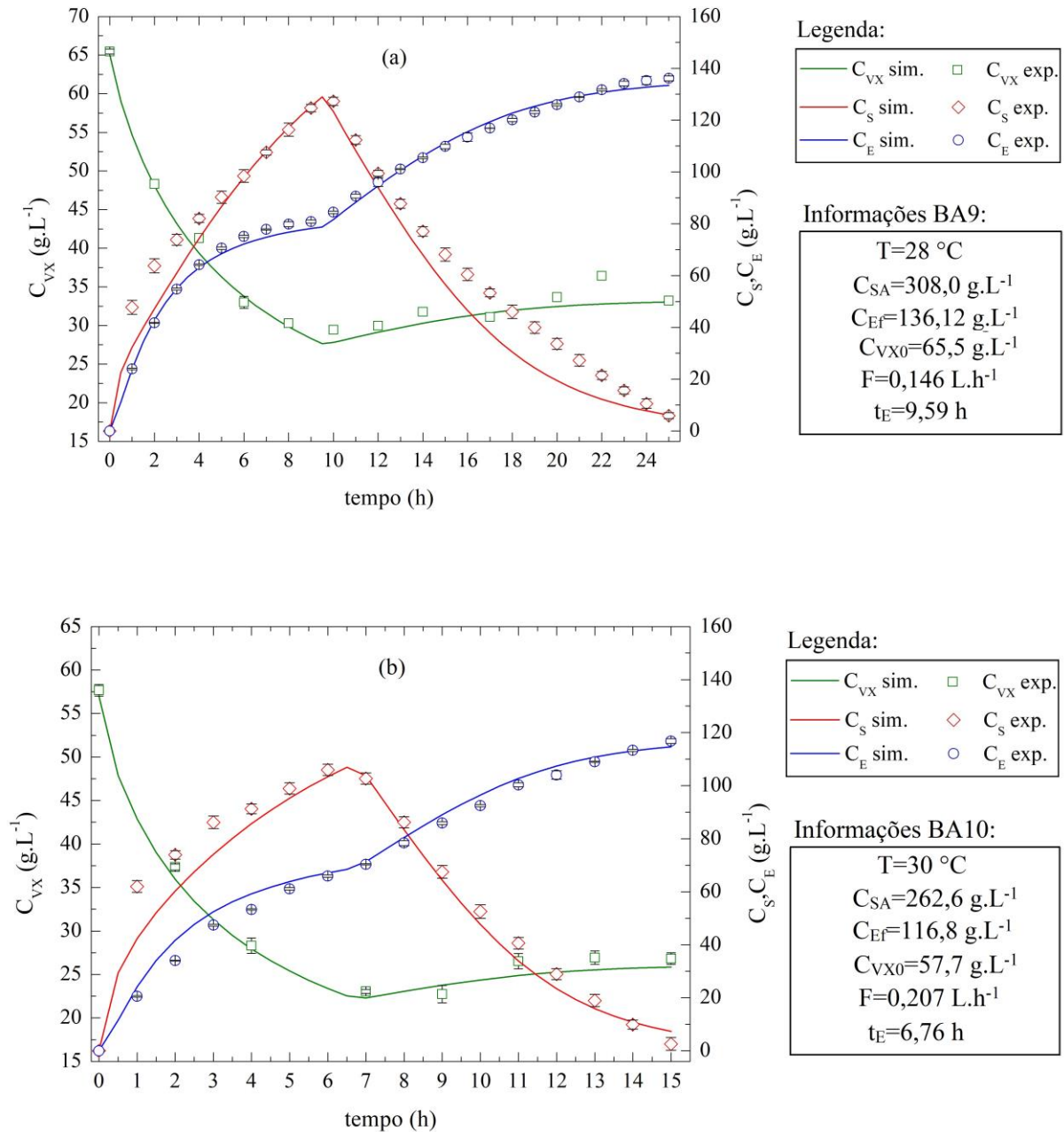
Fermentações em Batelada Alimentada com elevada C_{SA} e C_{VX0}				
Parâmetros	BA9	BA10	BA11	BA12
T (°C)	28	30	32	34
μ_{max} (h⁻¹)	0,140	0,150	0,160	0,210
K_S (g.L⁻¹)	30	40	60	85
K_{IS} (g.L⁻¹)	100	100	100	100
$C_{E_{max}}$ (gE.L⁻¹)	145,0	125,0	108,0	94,8
n (-)	1,00	0,70	0,45	0,28

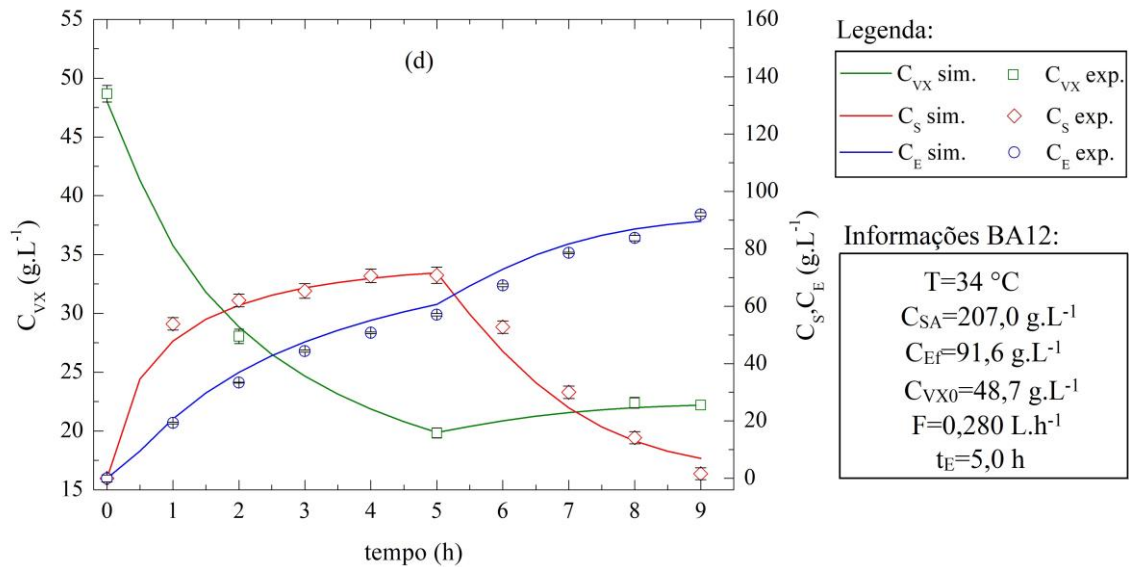
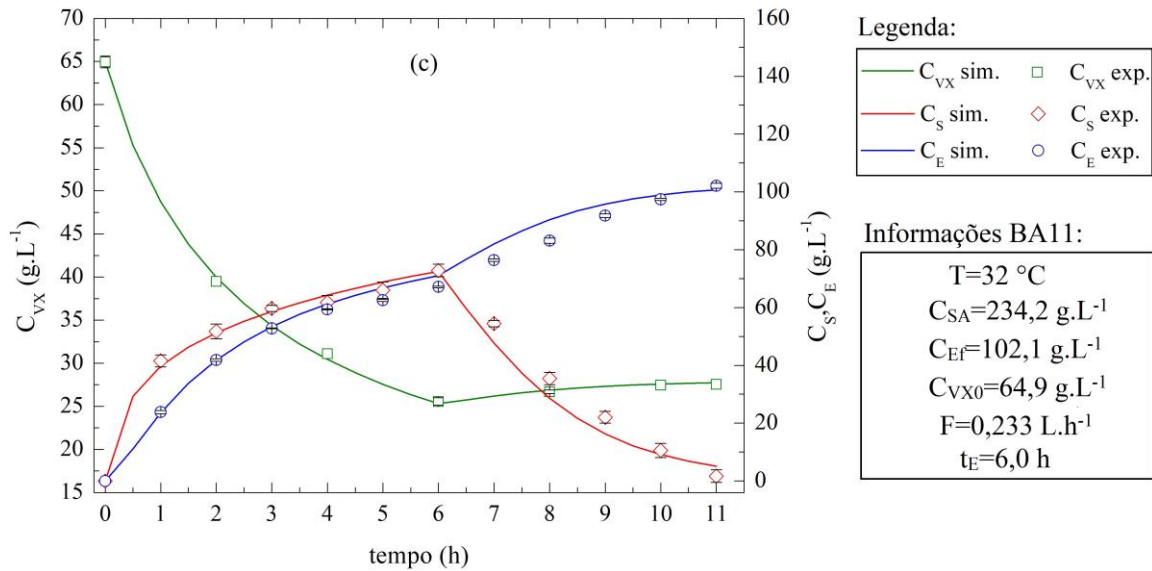
Fonte: acervo pessoal do autor.

Comparando os valores dos parâmetros cinéticos utilizados na modelagem das fermentações BA5–BA8 com os valores apresentados da **Tabela 10**, observa-se uma variação na faixa de 4,5–18% em μ_{max} , 8,2–84% em K_S , 41,2% em K_{IS} , 1,1–4,9% em $C_{E_{max}}$ e 12,5–37% em “n”. Ressalta-se que alguns parâmetros tiveram maiores variações, como K_S que apresentou aumento de 84%, enquanto outros parâmetros apresentaram pequenas variações, como $C_{E_{max}}$. Isto acontece por que os parâmetros do modelo estão fortemente correlacionados, como pode ser visto na **Equação 24** (modelo de Andrews-Levenspiel).

A **Figura 18** (a)–(d) mostra a comparação dos valores experimentais (símbolos) e simulados (linhas) de C_S , C_{VX} e C_E utilizando os parâmetros cinéticos da **Tabela 10**.

Figura 18 – Valores de concentrações simuladas (–) e experimentais (símbolos) de substrato (C_S), etanol (C_E) e células viáveis (C_{VX}) ao longo das fermentações em BA com altas concentrações de substrato e células do inóculo: (a) BA9, (b) BA10, (c) BA11 e (d) BA12. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.





Fonte: acervo pessoal do autor.

Portanto, conclui-se que a alteração nos parâmetros cinéticos originais foi suficiente para o ajuste do modelo aos dados experimentais. O reajuste dos parâmetros pode estar relacionado à alguns fatores, como o lote de leveduras e/ou inibição celular. Os experimentos B1–B4 e BA1–BA8 foram realizados com um lote de levedura liofilizada, sendo as últimas fermentações (BA9–BA12) realizadas com outro lote. Provavelmente, a cinética de crescimento do microrganismo pode apresentar pequenas variações em decorrência da diferença entre lotes. A variação nos parâmetros pode também ser atribuída à inibição celular, já que foram adicionadas grandes quantidades de massa celular (células totais). Logo, seria necessário utilizar modelos cinéticos que considerem os três tipos de inibição (substrato, células e produto), sendo essa uma sugestão para trabalhos futuros.

É importante ressaltar que, para fins de aplicação em larga escala, o modelo proposto no presente estudo deve ser validado utilizando condições mais próximas das industriais. A concentração de células iniciais (inóculo) utilizada neste estudo é cerca de duas vezes menor que a empregada no processo industrial. A levedura utilizada encontrava-se em diferentes condições de adaptação (*não-stress*), pois não foi submetida a ciclos repetitivos de reativação como na indústria (reciclo celular) e mostos compostos por melaço e caldo de cana não foram utilizados. Além disso, o inóculo não apresentou etanol em sua composição, enquanto que no processo industrial o inóculo vem da reciclagem com um teor razoável de etanol (30–40 g.L⁻¹).

6. CONCLUSÕES

A redução da temperatura de fermentação permitiu o aumento da concentração de substrato na alimentação e, como consequência, maior concentração de etanol no vinho devido ao aumento da resistência da levedura ao etanol.

Os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews-Levenspiel obtidos a partir de fermentações em batelada com concentrações iniciais de 180,0 g.L⁻¹ de substrato, considerando células viáveis para temperaturas na faixa de 28–34 °C, foram utilizados nas simulações de fermentações em batelada alimentada. Os resultados mostraram que o modelo foi capaz de prever satisfatoriamente o comportamento das fermentações. Os parâmetros cinéticos foram utilizados na rotina de otimização de forma a obter vazões de alimentação que maximizaram a produtividade das fermentações em batelada alimentada, mantendo a concentração de substrato abaixo de 150,0 g.L⁻¹.

A estratégia de otimização proposta para obter vinhos com a máxima concentração de etanol possível para cada condição de temperatura, com base no parâmetro C_{Emax} do modelo cinético de Andrews-Levenspiel, permitiu obter vinhos com concentrações finais de etanol de até 134,7 g.L⁻¹ (17,1 °GL), o que implicaria em reduções na geração de vinhaça e no consumo de vapor na destilação para a recuperação do etanol.

Uma modificação no modelo cinético de Andrews-Levenspiel foi proposta relacionando o parâmetro n à concentração final de etanol (C_{Ef}), para permitir que o modelo descrevesse o comportamento das fermentações em BA com alta concentração de substrato, em temperaturas na faixa de 28 a 34 °C.

Fermentações realizadas com elevadas concentrações de substrato e de células viáveis mostraram que o aumento de células no inóculo contribui para o aumento da produtividade. No entanto, o modelo com parâmetros originais não representou o comportamento dinâmico do processo, sendo necessário um reajuste do modelo aos dados experimentais com a estimativa de novos parâmetros cinéticos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o uso de outros modelos cinéticos híbridos com inibição por substrato, etanol e células.
- Simular a fermentação extrativa com arraste de etanol por CO₂ nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, visando o aumento da produtividade do processo.
- Validação experimental de fermentações extrativas com arraste de etanol por CO₂ nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, nov. 1968.

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Continuous estimation of product concentration with calorimetry and gas analysis during anaerobic fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Thermochimica Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 185–190, 2002.

ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 217–222, 2004.

ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos). Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade de Campinas. Campinas, p. 83, 1996.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Processos de produção de álcool - Controle e monitoramento. Editora Fermentec/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba, SP, p. 103, 1996.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; CASTRO OLIVEIRA, J. V. DE; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, 1968.

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL, R.; MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 91–93, p. 353–365, 2001.

ATALA, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. **Reatores Químicos e Bioquímicos**. Coleção UAB-UFSCar, São Carlos, 2012.

BARGA, M. C. Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido. Dissertação. Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85–100, 2011.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das Fermentações: Fundamentos de Bioprocessos**. EdUFSCar, 2010, 162 p.

BATISTA, M. A. Estudo da Imobilização de Células de *Saccharomyces cerevisiae* em Gel de Alginato de Cálcio no Processo de Fermentação Alcoólica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p. 136, 2005.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. v. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, p.123-178, 2001.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. In: **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, cap. 9, p. 193-204, 2001.

CHENG, J. J. Introduction. In: CHENG, J. J. **Biomass to Renewable Energy Processes**. Second edition, CRC Press, North Carolina. p. 436, 2018.

CLERAN, Y.; THIBAUT, J.; CHERUY, A.; CORRIEU, G. Comparison of prediction performances between models obtained by the group method of data handling and neural networks for the alcoholic fermentation rate in enology. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 5, p. 356–362, 1991.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 2 - Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento. Abril de 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento. Abril de 2018.

CONTOIS, D. E. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures, **Journal of General Microbiology**, v. 21, p. 40-50, 1959.

CRUZ, M. L. Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 100 p., 2015.

CRUZ, M. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E.J. Evaluation of process conditions in the performance of yeast on alcoholic fermentation, **Chemical Engineering Communication**. v. 205, p. 846–855, 2018.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 6, p. 322–330, 1987.

DAI, W.; WORD, D. P.; HAHN, J. Control Engineering Practice Modeling and dynamic optimization of fuel-grade ethanol fermentation using fed-batch process. **Control Engineering Practice**, p. 1–11, 2013.

DARÉ, R. M. Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 67 2008.

DEED, R. C.; DEED, N. K.; GARDNER, R. C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature during wine fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 1029–1048, 2015.

DIAS, M. O. S. Simulação do processo de produção de etanol a partir de açúcar e do bagaço visando a integração do processo de maximização da produção de energia e excedentes do bagaço. 282 p. Dissertação – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F. Improving bioethanol production - Comparison between extractive and low temperature fermentation. **Applied Energy**, v. 98, p. 548–555, 2012.

DIAS, M. O. S.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. L. R. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**. v. 15, p. 35-51, 2015.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. In: **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, cap. 12, p. 223-246, 2001.

FERNANDES, A. P. F. V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudo sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática. Tese de Doutorado. Faculdade de ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2008.

FERNANDES, P. M. B. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Primeira Edição, Edufes, Vitória, ES.. p. 119, 2009.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Revista Química Nova**. v. 28, n 5, p. 871-879, 2005.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes : Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International sugar journal**, v. 110, n. 1311, p. 171–181, 2008.

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, p. 206, 1988.

HENDLER, B. Construção de um Software de Simulação e Modelagem Para Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada, Considerando Diauxia Para a Glicose e a Frutose. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2, cap. 6, p. 93-122, 2001.

HOPPE, G.K.; HANSFORD, G.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth, **Biotechnology Letters**, v. 4, no 1, 39-44, 1982.

HOUGH, J. S.; MADDOX, I. S. Yeast Autolysis. **Process Biochemistry**. v. 210, p. 50-52, 1970.

HUANG, W. H.; SHIEH, G. S.; WANG, F. S. Run-to-run optimization of fed-batch fermentation for ethanol production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 9, p. 1488–1494, 2010.

HUNTER, K.; ROSE, A. H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 260, p. 639-653, 1972.

KARAPATSIA, A.; PENLOGLOU, G.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. Biomass and Bioenergy Fed-batch *Saccharomyces cerevisiae* fermentation of hydrolysate sugars : A dynamic model-based approach for high yield ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 90, p. 32–41, 2016.

KNOWLES, G.; DOWNING, A. L.; BARRETT, M. J. Determination of Kinetic Constants for Nitrifying Bacteria in Mixed Culture, with the Aid of an Electronic Computer. **Journal of General Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 263–278, 1965.

- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts**. ed. 2. London: Academic Press. p. 5-61, 1987.
- LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. - "Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 497-511, 1983.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. S. S. Lee, F. M. Robinson, H. Y. Wang, Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LEMOES, D. A.; SONEGO, J. L. S.; BOSCHIERO, M. V.; et al. Selection and application of nontoxic solvents in extractive ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 128-135, 2017.
- LESSMANN, W. F. Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL3112 para concentrações de polissacarídeos de 40 e 80 g/l. Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica – USP, São Paulo, 1993.
- LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671-1687, 1980.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A.; **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**, Editora UFPR: Curitiba, p. 248, 2002.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v. 3, cap. 1, p. 1-43, 2001.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L.S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2000.
- LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. Controle na fabricação de álcool. São Carlos, SP, Ed. UFSCar, 95 p., 2009.
- LOPES, J. J. C.; PARAZZI, C. Fermentação alcoólica. Araras, SP, UFSCar/DTAiSER, 26 p., 2007.

- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. DE L.; GODOY, A.; et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.
- LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. Biocombustíveis, (org). Interciência. v. 2, p. 1158, 2012.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of biochemical and microbiological technology and engineering**. v. 1, n. 4, p. 393–412, 1959.
- MAGAZONI, F. C. Análise dinâmica de um chiller de absorção de brometo de lítio-água em processo de resfriamento de dorna de fermentação alcoólica. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103–121, 1983.
- MICHELLON, E.; SANTOS, A.; JULIANO, R. Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil. **Estrutura, Evolução e dinâmica do sistemas alimentares e cadeias agroindustriais.**, p. 1–16, 2008.
- MOHD AZHAR, S. H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, n. February, p. 52–61, 2017.
- MONOD, J. Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes, **Hermann & Cie.**, Paris, 1942.
- MOSER, H. The dynamics of bacterial population maintained in the chemostat, **Carnegie Institute of Washington**, Washington, 1958.
- NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina sucroalcooleira. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v. 6, n. 11, p. 17, 2010.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 1, p. 36–43, 2006.

RATLEDGE, C.; EVANS, C. T. Lipids and their metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeast**. Second edition. London: Academic Press, v. 3, p. 367–455, 1989.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para a produção de etanol. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

REST, M. E; KAMMINGA, A. H.; NAKANO, A.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 59, n 2, p. 304–322, 1995.

RFA - Renewable Fuels Association, Industry Statistics - World Fuel Ethanol Production, 2017, Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>>. Acesso em Agosto de 2018.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; et al. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1682–1687, 2006.

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; SAAD, M. B. W.; et al. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 42–51, 2017.

ROCHA, M.; MENDES, R.; ROCHA, O.; ROCHA, I.; FERREIRA, E. C. Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms. **Expert Systems with Applications**, v. 41, n. 5, p. 2186–2195, 2014.

RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; BERNARDO, A.; RIBEIRO, M. P. A.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. Real-time monitoring of bioethanol fermentation with industrial musts using mid-infrared spectroscopy, **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 57, p. 10823–10831, 2018a.

RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BERNARDO, A.; BADINO, A. C. Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 132, p. 77–88, 2018b.

RUIZ, L. Economia de milhões de reais. **Revista cana online**. n 25, p. 71-77, 2015.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R.. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2, cap. 8, p. 179-192, 2001.

SCHULZ, M. A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

SHULER, M. L.; KARGI, F. How Cells Grow. In: M. L. SHULER, M. L.; KARGI, F (Eds.), **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Second edition, Prentice Hall PTR, New Jersey, p. 155-206, 2002.

SILVA, A. J. N.; CABEDA, M. S. V. Seção I - Física Do Solo Compactação E Compressibilidade Do Solo. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 30, n. 2, p. 921–930, 2006.

SILVA, M. A.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, C. Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 11, n. 1 p. 108-114, 2007.

SONEGO, J. L. S. Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 139 p., 2016.

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Optimization of Fed-Batch Fermentation with in Situ Ethanol Removal by CO₂ Stripping. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 1, p. 954–960, 2018.

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; RODRIGUEZ, G. Y.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Extractive Batch Fermentation with CO₂ Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552–7559, 2014.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan IPT, São Paulo, 2009.

TAYLOR, F.; MARQUEZ, M. A.; JOHNSTON, D. B.; GOLDBERG, N. M.; HICKS, K. B. Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4403–4408, 2010.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 2, p. 289–297, 1992.

TOPIWALA, H.; SINCLAIR, C. G. Temperature relationship in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, n. 6, p. 795–813, 1971.

TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47–53, 2003.

TOSETTO, G. M., Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2002).

VICENTE, F. A. C. F. Seleção, Avaliação e Utilização de uma Levedura Personalizada para a Produção de Etanol. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, SP, 112 p., 2015.

WANDERLEY, M. T. Estudo da termo-tolerância e parâmetros cinéticos da *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.

WANG, F. S.; CHENG, W. M. Simultaneous optimization of feeding rate and operation parameters for fed-batch fermentation processes. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 949–952, 1999.

WESTERMANN, P.; AHRING, B. K.; MAH, R. A. Temperature Compensation in *Methanosarcina barkeri* by Modulation of Hydrogen and Acetate Affinity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1262–1266, 1989.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol**, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1999.

WU, Y. C.; HAO, O. J.; OU, K. C.; SCHOELZE, R. J. Treatment of leachate from solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 257-266, 1988.

APÊNDICE I

Pseudocódigo do programa para estimar parâmetros cinéticos de cultivos em batelada (implementados no *software* Scilab)

Início

Ler dados experimentais

dados = [t, C_{VX}, C_S, C_E]

Chamada da função Bat

function [dw]=Bat(t,y)

C_{VX} = y(1);

C_S = y(2);

C_E = y(3);

$\mu = \mu_{\max} * C_S / (K_S + C_S + C_S * (C_S / K_{IS})) * (1 - C_E / C_{E_{\max}})^n$;

Y_{X/E} = Y_{VX/S} / Y_{E/S};

dC_{VX} = $\mu * C_{VX}$;

dC_S = $-\mu * C_{VX} / Y_{VX/S}$;

dC_E = $\mu * C_{VX} / Y_{X/E}$;

dw = [dC_{VX}, dC_S, dC_E]

Fim da função

Chute inicial dos parâmetros a serem estimados

(μ_{\max} , K_S, K_{IS}, C_{E_{max}}, n)

Ler parâmetros do modelo

(Y_{VX/S}, Y_{E/S}, C_{SM})

Ler dados de inicialização do algoritmo de minimização do custo (optmin_ga)

(PopSize, Proba_cross, Proba_mut, NbGen, NbCouples, Log)

ga_params = init_param();

ga_params = add_param(ga_params, "minbound", [0.1;2;80;0.01;80]);

ga_params = add_param(ga_params, "maxbound", [0.5;80;180;1;100]);

ga_params = add_param(ga_params, "dimension", 3);

Chamada do pacote de otimização (optmin_ga)

[pop_opt, fobj_pop_opt] = optmin_ga(cost, PopSize, NbGen, Proba_mut, Proba_cross, Log, ga_params);

Chamada da função custo

```
function [Custo]=cost(par)
```

```
 $\mu_{\max}$ =par(1);
```

```
KS=par(2);
```

```
KIS=par(3);
```

```
CEmax=par(4);
```

```
n=par(5);
```

Chamada do pacote de integração (ode)

```
y=ode("rk",y0,t0,t,10e-6,10e-6, Bat)
```

```
E=y`;
```

```
o2 = sum((E(:,2)/max(dados(:,3))- dados(:,3)/max(dados(:,3))).^2)
```

```
o3 = sum((E(:,3)/max(dados(:,4))- dados(:,4)/max(dados(:,4))).^2)
```

```
Custo=(o2+o3)
```

Ler dados para integração da EDO**Intervalo de integração (tempo)**

```
(t0, tf, himp)
```

Condições iniciais do problema

```
(CVX0, CS0, CE0)
```

Fim da integração**Fim da função custo****Fim da minimização do custo****Impressão dos resultados (gráfico)**

```
plot (argumentos da função)
```

Impressão dos parâmetros estimados

```
disp ([par(1),par(2),par(3),par(4),par(5),Custo])
```

Fim

APÊNDICE II

Pseudocódigo do programa para otimização da vazão de alimentação (F) em cultivos em batelada alimentada (implementados no *software* Scilab).

Início

Chamada da função Fbat

```
function [dw]=Fbat(t,y)
    CVX = y(1);
    CS = y(2);
    CE = y(3);
    V = y(4);
     $\mu = \mu_{\max} * C_S / (K_S + C_S + C_S * (C_S / K_{IS})) * (1 - C_E / C_{E_{\max}})^n$ ;
    YX/E = YVX/S / YE/S;
    dCVX = ( $\mu - F/V$ ) * CVX;
    dCS = (CSM - CS) * F/V -  $\mu * C_{VX} / Y_{VX/S}$ ;
    dCE =  $\mu * C_{VX} / Y_{X/E} - C_E * F/V$ ;
    dV = F;
    dw = [dCVX, dCS, dCE, dV]
```

Restrição de alimentação

```
    if t > 1.4/F then
        F=0.0;
    end
```

Fim da função

Entrada de dados

(μ_{\max} , K_S, K_{IS}, C_{E_{max}}, n, Y_{VX/S}, Y_{E/S}, C_{SM})

Ler dados de inicialização do algoritmo de otimização (optmin_ga)

```
(PopSize, Proba_cross, Proba_mut, NbGen, NbCouples, Log)
ga_params = init_param();
ga_params = add_param(ga_params, "minbound", [0.23]);
ga_params = add_param(ga_params, "maxbound", [0.46]);
ga_params = add_param(ga_params, "dimension", 2);
```

Chamada do pacote de otimização (optmin_ga)

```
[pop_opt, fobj_pop_opt] = optmin_ga(cost, PopSize, NbGen, Proba_mut, Proba_cross, Log, ga_params)
```

Chamada da função custo

```
function [Custo]=cost(par)
```

```
F=par(1);
```

```
Prod=(EtT/t);
```

```
Custo= - Prod;
```

Chamada do pacote de integração (ode)

```
ode("rk",y0,t0,t,10e-6,10e-6,Fbat)
```

Condições iniciais do problema

```
(Cvx0, Cs0, CE0, V0)
```

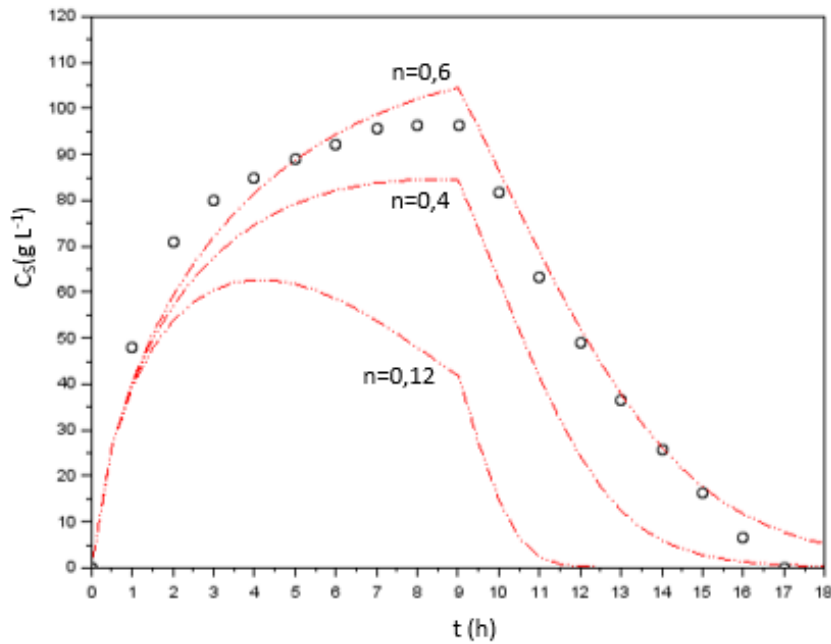
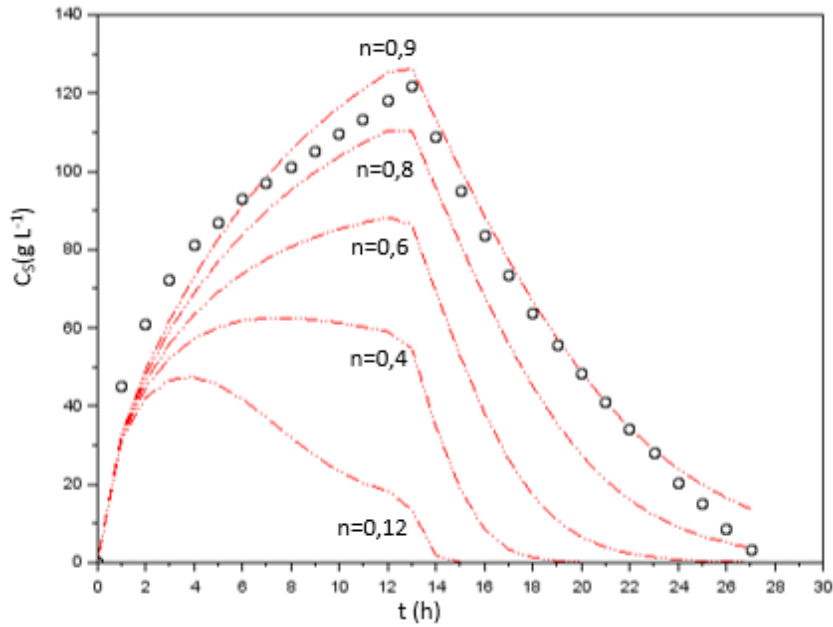
Fim da integração**Fim da função custo****Fim da otimização****Impressão dos resultados**

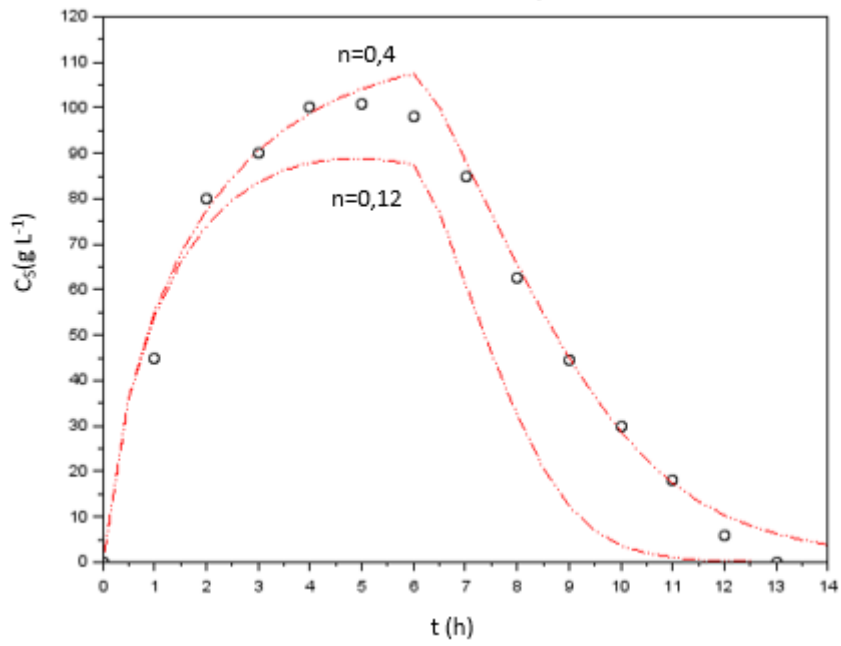
```
disp = ([F, Prod]);
```

Fim

APÊNDICE III

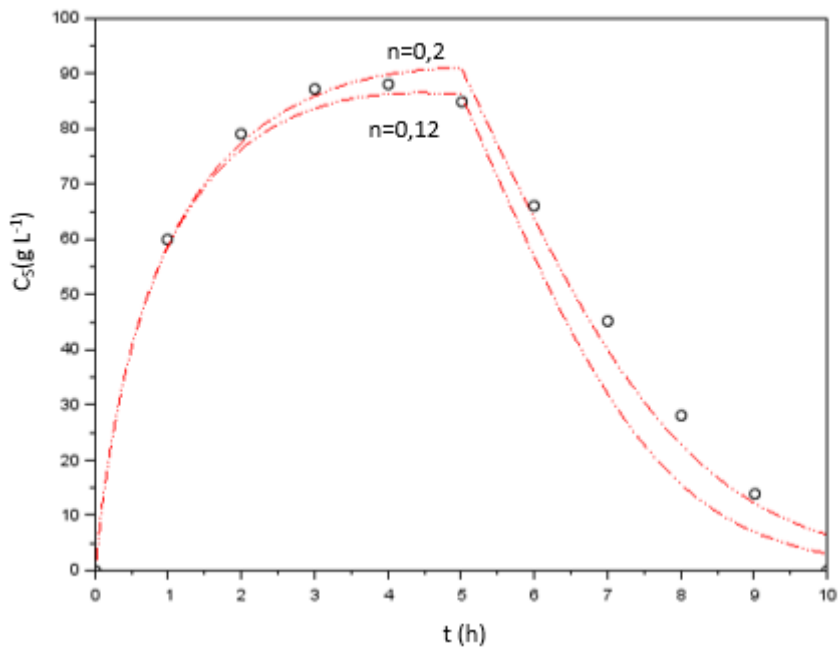
Ajustes do modelo aos dados experimentais de concentração de substrato ao longo do tempo para as fermentações BA5-BA8 para diferentes valores do parâmetro “n” (gráficos obtidos no *software* Scilab).





Informações BA7:

$T=32\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $C_{SA}=234,2\text{ g.L}^{-1}$
 $C_{E,f}=103,8\text{ g.L}^{-1}$
 $F=0,227\text{ L.h}^{-1}$
 $t_E=6,17\text{ h}$



Informações BA8:

$T=34\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $C_{SA}=207,4\text{ g.L}^{-1}$
 $C_{E,f}=92,2\text{ g.L}^{-1}$
 $F=0,280\text{ L.h}^{-1}$
 $t_E=5\text{ h}$